

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



PRODUCCION DE LA ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA
POR UNA MUTANTE CONSTITUTIVA DE Arthrobacter
novus sp. SIMPLIFICACION DEL MEDIO DE CULTIVO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

JOSE MANUEL MUÑOZ AGUILAR

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
1) INTRODUCCION	1
2) GENERALIDADES	10
2.1 Introducción a los Procesos de Fermentación	10
2.2 Propiedades de Glucosa Isomerasa	17
2.3 Producción de Jarabes con Alto Contenido en Fructosa por Métodos Químicos	19
2.4 Producción de Jarabes con Alto Contenido en Fructosa por el Método Enzimático	20
2.5 Microorganismos Productores de Glucosa Isomerasa	21
3) MATERIALES Y METODOS	31
3.1 Microorganismos y Medios de Cultivo	31
3.2 Metodología para el Cultivo de <u>Arthrobacter</u>	33
3.2.1 Propagación de la Cepa Madre	33
3.2.2 Preparación de Semilla para Crecimiento	33
3.2.3 Preparación y Concentración del Inóculo	35
3.3. Cosecha de Biomasa	35
3.4. Determinación de Crecimiento Celular	36
3.5 Determinación de Actividad Enzimática	36
3.6 Determinación Colorimétrica de D-fructosa	38
3.7 Determinación Colorimétrica de D-Glucosa	38
3.8 Método de Lisis Celular	40
4) RESULTADOS Y DISCUSION	42
4.1 Selección de la cepa de Trabajo y Ensayo de Ruptura Celular	42
4.2 Evaluación de los Medios de Cultivo de Grado Reactivo	46

	Pág.
4.3 Efecto de la Forma de Esterilización de los Medios de Cultivo y Lavado Celular sobre la Actividad Enzimática	51
4.4 Efecto de Diferentes tipos de Agua sobre la Actividad Enzimática	53
4.5 Evaluación del Método de Glucosa Oxidasa para Determinación de la Actividad Enzimática de Glucosa Isomerasa	56
4.6 Efecto de la Fuente de Carbono sobre la Actividad de Glucosa Isomerasa	57
4.7 Efecto de la Fuente de Nitrógeno en el Medio	60
4.7.1 Efecto de la Interacción de la Fuente de Nitrógeno de Prueba con la Fuente de Carbonos de Grado Reactivo	62
4.7.2 Efecto de la Interacción de Diferentes Fuentes de Nitrógeno con Melaza	64
4.7.3 Efecto de la Interacción de dos Fuentes de Nitrógeno con Melaza	67
4.7.4 Efecto de la Interacción de Melaza con dos Diferentes Fuentes de Nitrógeno	70
4.7.5 Tratamiento al Medio de Cultivo Control y al Medio de Sustitución con NH_4OH . Efecto sobre Actividad	72
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFIA	79

1) INTRODUCCION

De los carbohidratos utilizados tanto a nivel industrial como doméstico, el azúcar representa la fuente más importante por sus propiedades organolépticas. La relativa facilidad con la que se obtiene, también es otra de sus características, ya que esto se puede hacer por cristalización repetida a partir del jugo de la remolacha o de la caña de azúcar.

En la pasada década, la demanda mundial de azúcar ha sido superior a la oferta, además, por diversas circunstancias la producción del dulce bajo y el panorama en los años venideros se presenta aún más difícil. Esta situación ha provocado aumento en los precios del azúcar a niveles considerablemente altos. La situación es aún más crítica para los países no productores entre los que se encuentra México, ya que de exportador hasta 1979, en 1980 se convirtió en importador, como lo demuestran los datos de la Comisión Nacional de la Industria Azucarera (CNIA), la Unión Nacional de Productores de Azúcar (UNPASA) y la Secretaría de Programación y Presupuesto (SPP), quienes señalan que durante este año el país importará 792 mil toneladas de azúcar a un precio aproximado de 574 millones 829 mil dólares (Publicaciones de la SPP y BCE de 1981), para satisfacer una demanda interna (3.5 millones de toneladas), que en su mayor parte (81.9%), está determinada por los requerimientos de las industrias refresqueras, dulceras y galleteras (Tabla 1).

Tabla 1

DISTRIBUCION DEL CONSUMO INDUSTRIAL DE
AZUCARES EN MEXICO DURANTE 1980

Tipo de Industria	Consumo (%)
Industria Refresquera	56.6
Industria Dulcera	12.6
Industria Panificadora y Galletera	12.7
Industria del Vino	3.9
Empacadoras y otros	14.2

Fuente: (UNPASA, 1981)

El estudio de la SPP, explica que durante el período 1970-80, la producción de azúcar creció a una tasa media de 1.6% anual, en tanto que el consumo lo hizo a razón de 5.0% en promedio anual, de tal forma que al finalizar el período, la industria registró un déficit de 409 mil toneladas equivalentes al 13.6% del consumo.

El crecimiento de la demanda responde pues al incremento del consumo industrial que en el mismo período aumentó a una tasa media del 7.8% anual, a su vez el consumo doméstico se incrementó en un 2.6% al año. Sin embargo, en el lapso 1975-80 el consumo industrial aumentó 9.2% en promedio anual mientras que el doméstico permaneció estable.

Asimismo, la participación del consumo industrial en el total de la demanda interna, aumentó de 41.4% en 1970 a 53% en 1980.

La SPP añade que el consumo per cápita de azúcar, evolucionó durante el período 1970-80 a un ritmo de 1.6% anual, alcanzando 44.7 Kg. per cápita en 1980.

La capacidad instalada en el sector industrial azucarero, - permaneció casi constante, con crecimiento de sólo 1.0% durante el período 1970-79. Este estancamiento se debió fundamentalmente a los bajos - rendimientos financieros y a la escasa productividad de la industria, lo que ha ocasionado una disminución de las inversiones privadas, tanto para la creación de nuevos ingenios como para el mejoramiento de los ya existentes (Tabla 2).

La tendencia al alza en los precios del azúcar, así como su creciente demanda, han originado la búsqueda de nuevas fuentes de dulce que puedan aliviar los requerimientos de la misma y contribuyan a estabilizar su precio.

Dentro de los diversos productos que han sido incorporados como sustitutos del azúcar cabe mencionar a los siguientes:

Azúcar Invertido. El azúcar invertido es el nombre que se - le da al producto de la hidrólisis de la sacarosa, produciéndose una mezcla de glucosa y fructosa, esta mezcla es tan dulce como la sacarosa, debido a la presencia de fructosa, pero dado su origen, no puede ser considerado como un sustituto del azúcar y sólo se menciona con fines de comparación. Este tipo de hidrólisis es catalizado por una enzima conocida comercialmente como invertina ó invertasa.

Tabla 2

DESARROLLO DE LA INDUSTRIA AZUCARERA

Zafra	Superficie cultivada (mil. de ha)	Superficie cosechada (mil. de ha)	Rendimiento Tons./ha.	Contenido sacarosa %	Caña molida miles tons	Producción de azúcar miles tons.	Rendimiento tons. azúcar/ tons. caña molida
1970	413.9	402.9	60.9	11.41	24524	2208	8.9
1971	427.4	416.6	62.4	11.54	25985	2393	9.1
1972	426.8	413.8	63.4	11.39	26254	2359	8.9
1973	452.7	440.3	67.8	11.26	29849	2569	8.6
1974	456.4	447.2	68.2	11.33	30492	2632	8.6
1975	460.4	449.6	64.4	11.43	28949	2548	8.7
1976	446.2	439.6	62.7	11.91	27236	2547	9.3
1977	431.3	415.8	67.2	12.01	27947	2541	9.1
1978	461.1	445.2	72.7	11.63	32347	2849	8.8
1979	474.2	462.8	73.2	11.58	33865	2880	8.5
1980*	487.7	478.6	65.5	n.d.	31342	2603	8.3

* Datos preliminares.

Fuente: (SPP, 1981)

Fructosa. La fructosa es un monosacárido que se encuentra en elevadas concentraciones (40-50%) en la miel y en algunas frutas como la manzana y las uvas. En la actualidad se produce a partir del azúcar invertido, aunque puede también obtenerse de los jarabes de glucosa ricos en fructosa, a través de un proceso de separación de la glucosa, utilizando bajas temperaturas (Melaja, 1972). Su poder edulcorante es grande en relación a la sacarosa (1.2 a 1.5 veces mayor), aunque varía en función de las condiciones en que se pruebe. Posee además otras propiedades que lo hacen más atractivo para la industria farmacéutica y alimenticia como su baja viscosidad en relación tanto de la glucosa, como de la sacarosa, así como su independencia de insulina para ser metabolizada. Sin embargo, a pesar de todas las características mencionadas, su proceso de producción es costoso aún, al carecer de un proceso de separación efectivo de la glucosa.

Maltosa. La maltosa es un disacárido que se produce por hidrólisis enzimática del almidón. Su valor edulcorante es bajo en relación a la sacarosa aunque puede ser mejorado si se convierte en maltulosa o maltitol (Mitsubishi, 1974).

Xilitol. Otro ejemplo interesante es un alcohol pentahídrico denominado xilitol, el cual se encuentra en la naturaleza en algunas frutas y vegetales y que ha sido considerado como uno de los sustitutos del azúcar con más potencial en el futuro (Nicol, 1977). Este compuesto se produce comercialmente por hidrogenación del carbohidrato D-xilosa y tanto su valor calórico como edulcorante son parecidos al azúcar o sacarosa. Estas características, junto con su capacidad aparente de prevenir las

caries dentales han determinado que la industria alimenticia ponga gran interés en su utilización. Sin embargo, hay que mencionar que debido a lo complejo y costoso de su proceso de producción, hoy en día el costo del producto es más elevado que la sacarosa.

Jarabes de Glucosa. Los jarabes de glucosa, son obtenidos, por degradación ácida o enzimática del almidón de la papa o del maíz. Estos jarabes son ampliamente utilizados en la fabricación de dulces, refrescos y algunos alimentos. Sin embargo, más que utilizados como edulcorantes, por su propiedad de elevar la presión osmótica, son utilizados como preservadores (Kingma, 1966).

Jarabes de Glucosa Ricos en Fructosa. Estos jarabes, representan un sustituto interesante al ser producidos a partir de hidrolizados de almidón. Dichos jarabes poseen una mezcla de glucosa-fructosa con una relación aproximada de 1:1. El valor dulcificante de esta mezcla, se asemeja bastante al del azúcar invertido y sobrepasa de manera importante al mostrado por la glucosa sola (Tabla 3). La producción de estos jarabes se basa en la isomerización de D-glucosa por la enzima Glucosa Isomerasa. Sus características físicas y químicas se pueden ver en la Tabla 4.

Dichos jarabes, en la actualidad son utilizados popularmente por la industria refresquera, alimenticia y farmacéutica en aquellos países con limitaciones en la producción de azúcar como en Europa, los Estados Unidos y Japón. Se ha reportado que la producción de jarabes fructosados, sólo en los Estados Unidos fue de 1.9 millones de toneladas métricas (4.1 billones de libras), con un precio de venta de aproximadamente -

Tabla 3

*DULZOR RELATIVO DE DIFERENTES EDULCORANTES

Edulcorante	Dulzor (%)
Sacarosa	100
Fructosa	115 - 130
Glucosa	67 - 75
Azúcar invertido	95 - 100
Jarabes de glucosa-fructosa	95 - 100

*El dulzor relativo de éstos edulcorantes se probó en un intervalo de 10 a 15% de sólidos. (Whistler 1973)

Tabla 4

ANALISIS TIPICO DE UN JARABE DE GLUCOSA
CON ALTO CONTENIDO EN FRUCTOSA

Base húmeda		Base seca	
Sólidos	71 %	Cenizas (sulfatadas)	0.05%
Humedad	29 %	Monosacáridos:	
pH	4.3	Glucosa	50%
		Fructosa	42%
Kg/L a 100°F	1.33	Disacáridos	6%
Kg sólidos/L a 100°F	0,946	Trisacáridos + otros sacáridos	2%
Color	0.4		
(*CIRF por 100)			

* Corn Industries Research Foundations Units.
(Wardrip 1971)

1,250 millones de dólares en 1980, lo cual representa alrededor de un 40% del mercado industrial de edulcorantes en dicho país (Linko et al., 1977).

Este creciente desarrollo hace que de todos los edulcorantes ya señalados, los que reúnen las características más idóneas para ser producidos en nuestro país, como una alternativa que alivie el déficit de -- azúcar, son los Jarabes de Glucosa Ricos en Fructosa.

El objetivo de este trabajo es la producción de Glucosa Iso-merasa (materia prima para la producción de jarabes fructosados) a partir de Arthrobacter novus sp., en un medio de cultivo que utilice materias -- primas de grado industrial.

2) GENERALIDADES

2.1. Introducción a los Procesos de Fermentación

Dentro de cualquier proceso de fermentación, existe una fase previa, donde se buscan las condiciones óptimas para que el proceso transcurra con rendimientos lo suficientemente altos.

La explotación de un organismo vivo para fabricar una sustancia útil suele ser el elemento más característico en las aplicaciones de la microbiología a la industria. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un proceso biológico sólo alcanza su completa utilidad cuando está adaptado a un contexto de producción. En un proceso de fermentación industrial, las materias primas tienen que entrar en contacto con las células vivas o con algún componente extraído de éstas, por lo que deben mantenerse las condiciones ambientales que favorezcan las transformaciones bioquímicas de los materiales nutritivos en productos, con frecuencia los productos han de aislarse de otras sustancias con las que aparecen mezcladas. (Quintero, 1981).

Por lo tanto, la microbiología industrial debe poner especial cuidado en seleccionar microorganismos cuyo medio ambiente no sea difícil de controlar, al mismo tiempo se debe procurar que la tecnología desarrollada para mantener tanto a los microorganismos como a sus productos no debe ser muy sofisticada. Las etapas biológicas pueden conocerse casi siempre en términos de procesos químicos de catálisis. La transformación de un sustrato en el producto deseado es acelerada por la presencia de un catalizador y por consiguiente, se favorecen selectivamente sobre otras reaccio-

nes posibles.

De acuerdo con este esquema, un microorganismo constituye un catalizador de excepcional complejidad. Por ejemplo, la levadura empleada en la elaboración de la cerveza o el vino puede considerarse catalizador de la conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono. Por supuesto que los agentes reales de los cambios químicos son las enzimas sintetizadas por el microorganismo, y, en algunos casos, la propia enzima sirve en lugar de la célula entera. (Withaker, 1972).

Pero lo habitual es que la transformación biológica del sustrato incluya diversas reacciones químicas entrelazadas, cada una de ellas catalizada por una enzima distinta. En aquellos casos en que el proceso biológico es la síntesis de una molécula compleja, tal como de un antibiótico o de una proteína, se requiere la presencia de sistemas completos de enzimas. No se ha conseguido aún que tales procesos funcionen fuera de la célula viva. (Reed, 1975).

Una característica distintiva de un catalizador biológico, peculiaridad que tiene una influencia fundamental en el diseño de una planta industrial, es su exigencia de un medio controlado con precisión. También el catalizador inorgánico opera mejor en una combinación particular de temperatura, presión y otras condiciones físicas. Pero las condiciones sobre el funcionamiento de un catalizador biológico son mucho más estrictas y no tan drásticas. No se permite que la temperatura y el pH varíen fuera de un estrecho margen. Por otro lado, cuando el catalizador biológico son células vivas, el medio donde la reacción tiene

lugar debe proporcionar todos los nutrientes y otras sustancias necesarias para mantener el crecimiento.

El medio de cultivo proporciona los nutrientes y el ambiente donde el sustrato y el catalizador interaccionan, de ahí que el agua es el componente dominante en los medios de cultivo sumergido. En los cultivos en superficie, los organismos crecen con mínimas cantidades de agua (Quintero, 1981).

Una necesidad primaria es la fuente de carbono a quién normalmente corresponde suministrar la energía para el metabolismo. En la mayoría de las fermentaciones industriales la fuente de carbono es el sustrato de la reacción catalizada, como en la fermentación de sacarosa para la fabricación de etanol, en este caso específico, dicho azúcar tiene el doble papel de generador de energía y material de construcción celular. Los carbohidratos (entre los que se encuentran el almidón y la glucosa), constituyen la fuente habitual de carbono, además de éste, los nutrientes necesarios en cantidades sustanciales son nitrógeno y fósforo. Ambos elementos se incorporan en las moléculas estructurales y funcionales de las células y en algunas ocasiones forman parte de las moléculas del producto. Otros nutrientes, tales como vitaminas e iones, se requieren en menor cantidad.

Para los microorganismos aerobios el oxígeno es otro elemento cuyo suministro reviste especial importancia. Algunos microorganismos fermentativos son estrictamente anaerobios, ello vale decir que hay que escluir el oxígeno de su ambiente.

La explotación comercial de las enzimas arranca de la última década del siglo pasado, cuando se introdujo extracto de células fúngicas en las industrias cerveceras para acelerar la degradación de almidón a -- glucosa. Actualmente se fabrican una gran diversidad de enzimas (Tabla 5), cuatro de ellas revisten gran importancia por su producción a gran escala: Proteasa, Glucoamilasa, Alfa-Amilasa y Glucosa Isomerasa. Como se puede ver en dicha tabla, el amplio campo de aplicaciones de las enzimas, permite utilizarlas en la industria alimenticia, papelera, textilera, farmacéutica, de síntesis química, detergentes así como en análisis químicos (especialmente clínicos), en tratamiento de enfermedades y en la investigación básica. En ese amplio espectro de actividades, la aplicación de Glucosa - Isomerasa cae dentro de la categoría de los procesos industriales de gran escala y la búsqueda de tecnología que permitan su mejor aprovechamiento están siendo fuertemente desarrolladas.

Tabla 5

ENZIMAS DE ACTUAL USO INDUSTRIAL

Enzimas	Acción	Uso
α -amilasa	Hidroliza enlaces α (1-4) de almidón	Disminución de la viscosidad de fibras textiles; licuar almidón; producción de glucosa
β -amilasa exo-1,4- α -D-glucosidasa	Hidroliza enlaces α (1-4) de almidón	Producción de maltosa
Glucoamilasa	Reconoce los extremos no-reducidos de almidón e hidroliza unidades de glucosa	Sacarificación de maltas de destilería y cervecería; producción de glucosa
Invertasa	Conversión de sacarosa a glucosa y fructosa	Producción de dulces
Enzimas pécticas	Hidroliza enlaces α (1-4) D-galacturonidos en poligalacturonidos. Desmetilación de pectinas	Clasificación de jugos de frutas y vinos. ablandamiento de frutas
Celulasas	Hidroliza enlaces β (1-4) glucósidos de celulosa	Auxiliares de la digestión en fármacos. Hidrólisis de carbohidratos de pared celular compleja.
Catalasa	Catalisa la descomposición de agua oxigenada	Remueve el peróxido remanente, utilizado para esterilización

Tabla 5
(continuación)

Enzimas	Acción	Uso
Glucosa Oxidasa	Oxida glucosa o ácido glucónico en presencia de oxígeno	Remueve el oxígeno de productos <u>alim</u> enticios. Análisis clínicos.
Glucosa Isomerasa	Tranforma aldosas en cetosas	Producción de jarabes con alto contenido en fructosas.
Proteasas microbianas	Degrada proteínas, polipéptidos y péptidos	Aditivos en detergentes, clarificación de cerveza, ablandamiento de -carne
Proteasas vegetales		
Bromelina	Hidroliza péptidos, amidas y ésteres	Auxiliar de la digestión en fármacos, suavizadores de carne
Papaína	Hidroliza péptidos, amidas y ésteres particularmente de -aminoácidos básicos, leucina o glicina	Clarificación de cerveza
Pepsina	Hidrólisis de péptidos y de uniones cercanas a residuos aromáticos o dicarboxílicos de L-amino ácidos.	Auxiliar de la digestión en fármacos
Tripsina	Hidrólisis de péptidos, amidas y ésteres, que involucre el grupo carboxilo de L-argi <u>n</u> ina o L-lisina	Ablandamiento de pieles, auxiliar de la digestión en fármacos

Tabla 5
(continuación)

Enzimas	Acción	Uso
Reninas	Hidrólisis de péptidos. Hidrólisis de proteína de la leche	Fabricación de quesos
Lipasa	Hidrólisis de grasas y ésteres de ácido grasos	Modifica sabores, alterando las grasas de la leche
Pancreatina	Complejo multienzimático que incluye amilasa, lipasa, y pancreato peptidasas	Auxiliar de la digestión en fármacos

Fuente: (Thomas, Gulf 1982)
(Withaker, 1972)

2.2. Propiedades de Glucosa Isomerasa

La Glucosa Isomerasa es una enzima generalmente intracelular que cataliza la conversión de D-glucosa a D-fructosa (Fig. 1), y en realidad está clasificada como una Xilosa Isomerasa cuyo nombre correcto es (D-Xilosa cetol Isomerasa E. C. 5. 3. 1. 5) (Yamanaka, 1977). El interés comercial de esta enzima radica en que a través de su actividad se produce fructosa, que es un azúcar de 1.3 veces mayor poder edulcorante que la sacarosa y de 2.0 veces la glucosa (Tabla 3).

Hay que señalar que el efecto de isomerización, pueden sufrirlo otros azúcares como D-ribosa, D-alosa, L-arabinosa y L-ramnosa. Esta transformación dependerá de la fuente microbiana utilizada (Sánchez, Smiley, 1975).

La K_m (Constante de Michaelis) para D-glucosa, D-xilosa y D-ribosa varía de organismo a organismo, pero siempre en el intervalo de 0.086 - 0.920, 0.005 - 0.093 y 0.35 - 0.67 M respectivamente (Wen Pin -- Chen, 1980).

La gran mayoría de Glucosa Isomerasas encontradas hasta ahora, tienen una temperatura óptima relativamente alta, la cual oscila alrededor de 80°C. Pero hay informes que indican degradación de cetosas a altas temperaturas, por lo cual se recomienda trabajar a temperaturas menores que la óptima (Hodge, 1953).

El pH óptimo para esta enzima, oscila de 7.0 a 9.0, pero es conveniente trabajar al menor pH posible, para evitar la forma-

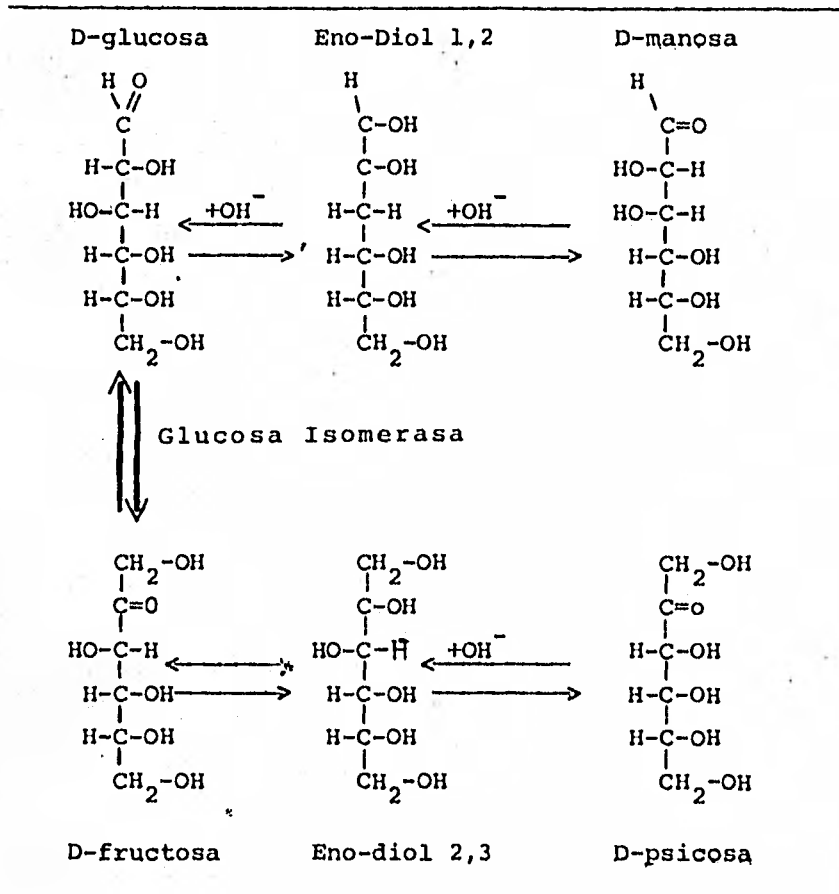


Figura 1. Isomerización de glucosa y fructosa

ción de D-psicosa (azúcar no metabolizable), lo cual sucede cuando se someten soluciones de glucosa bajo condiciones alcalinas y altas temperaturas (Lai, 1975).

Como muchas otras enzimas, Glucosa Isomerasa requiere para - su actividad catalítica en general, cationes divalentes tales como: - Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , ó una combinación de los mismos (Wen Pin Chen, 1980). Se sabe que estos cationes juegan un papel importante de protección con- tra la desnaturalización térmica de la enzima y de activadores de la -- reacción de isomerización. Una importante característica de la enzima - de algunas cepas como Arthrobacter sp., es que no requiere Co^{2+} para su actividad o estabilidad (Lee, 1972).

La actividad catalítica de Glucosa Isomerasa se inhibe en la presencia de Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} . Otros inhibidores son xili--tol, arabitol, sorbitol, manitol, lixosa y tris. (Danno, 1967; Yamanaka, 1968; Danno, 1970; Takasaki, 1969).

2.3. Producción de Jarabes con Alto Contenido en Fructosa por Métodos Químicos

Químicamente la transformación de D-glucosa a D-fructosa también es posible, y se logra calentando una solución de glucosa como jarabe de maíz, en presencia de un catalizador alcalino. Pero debido a - la pobre selectividad del catalizador, se producen varios subproductos - indeseables que acidifican y colorean el producto final. Para purificar el licor isomerizado químicamente, de los subproductos que -

le dan mal aspecto, se requiere de un proceso de refinamiento, el cual es sumamente costoso y complicado. Consecuentemente la isomerización alcalina no ha sido practicada comercialmente (Benyston y Lamm, 1972; Barker et al., 1975).

2.4. Producción de Jarabes con Alto Contenido en Fructosa por el Método Enzimático

Actualmente la producción de jarabes con alto contenido en fructosa se basa en la utilización de una enzima de origen microbiano, -- conocida comercialmente como Glucosa Isomerasa. El proceso de producción de estos jarabes se viene desarrollando desde hace 12 años, utilizando en general a la glucosa isomerasa dentro de la célula y en células inmovilizadas para la producción en lote y continua a escala industrial (Zittan y Pulsen, 1975). Como ejemplo podemos citar que Miles Laboratories, Inc. -- produce una Glucosa Isomerasa de Streptomyces olivaceus, inmovilizada intracelularmente (Miles Lab., 1974).

Por otro lado, se ha encontrado que al inmovilizar a la enzima a un soporte sólido, posee mayores ventajas que el retenerla dentro de la célula, puesto que se evita la presencia de otros contaminantes celulares, obteniéndose preparaciones con actividad específica elevada reduciéndose los volúmenes de enzima empleados para un proceso, y por lo tanto -- reduciéndose los costos de éste. Dado que el producto final es de mayor grado de pureza y se puede recuperar la enzima para su reutilización, los procesos industriales de producción han asimilado dicho método, al grado de que actualmente hay varias firmas comerciales que utilizan Glucosa Isomerasa inmovilizada a diferentes soportes para la producción de jarabes --

fructosados (Zittan, 1975; Schnyder, 1974).

La principal ventaja de utilizar Glucosa Isomerasa para producir jarabes con alto contenido en fructosa radica en la alta especificidad para llevar a cabo la isomerización, con lo que se evitan reacciones colaterales.

2.5 Microorganismos Productores de Glucosa Isomerasa

Dado que actualmente hay una gran cantidad de cepas productoras de Glucosa Isomerasa, fue necesario hacer una evaluación de los microorganismos mencionados en la literatura, y los que poseía el laboratorio, para utilizar aquel que proporcionara las mayores ventajas, tanto a escala de laboratorio, como a escala industrial.

En la actualidad hay aproximadamente 90 cepas productoras de Glucosa Isomerasa reportadas en la literatura, de las cuales sólo 40 son de potencial industrial, Tabla 6 (Wen Pin Chen, 1980).

Los trabajos los inició Marshall y Kooi, con una cepa de -- Pseudomona hydrophila, donde se encontró por primera vez la capacidad -- que tienen las bacterias para convertir glucosa en fructosa. (Marshall and Kooi, 1953). La actividad enzimática sólo se daba cuando se agregaba al medio de cultivo iones de arsenato, lo que imposibilitó su producción comercial ya que posiblemente se trataba de una hexosafosfato-isomerasa.

La búsqueda prosiguió con Yamanaka en bacterias ácido-heterolácticas, encontrándose en *Lactobacillus brevis* la mayor actividad. La enzima de esta cepa era económicamente atractiva, debido a su

bajo pH óptimo, pero era menos estable a altas temperaturas, lo que obstaculizó su producción comercial. (Yamanaka, 1963).

Trabajando con 300 cepas de Bacillus, Yoshimura (1966) aisló a una de ellas que crecía en xilosa como fuente de carbono a la cual clasificó como Bacillus coagulans HN-68. La producción enzimática de esta cepa aumentó cuando le fueron proporcionados iones manganeso al medio de cultivo. La enzima de este microorganismo, también resultó atractiva para la industria, debido a sus propiedades y a las condiciones de reacción que poseía.

Sin embargo, las especies de Streptomyces, han sido las más ampliamente estudiadas y de donde se han obtenido la mayor parte de enzimas comerciales. Como ejemplo, podemos citar a S. wedmorensis ATCC-21175, éste microorganismo fué la fuente de Glucosa Isomerasa para producir 500,000 toneladas de Jarabe de Maíz con Alto Contenido en Fructosa (Schnyder, 1974).

Los trabajos con Streptomyces, los inició Tsumura y Sato (1965), quienes descubrieron en S. phaeochromogenes SK, el primer microorganismo, de éste género, capaz de producir Glucosa Isomerasa. A partir de entonces se han reportado más de 26 cepas con capacidad de producir dicha enzima.

Cotter (1971), reportó, que S. albus YT-4 y YT-5, fueron productoras eficientes de la enzima. Paralelamente se estudiaron las cepas de S. venezuellae ATCC-21113 y S. olivochromogenes ATCC-21114 (Izuka, 1972). Los Laboratorios Miles, es una de las industrias que produce Glu-

cosa Isomerasa, usando S. olivaceus NRRL B-3588 (Miles Lab., 1974). Una mutante de éste microorganismo, la cepa NRRL B-3916, es usada a escala industrial, también por Miles Cargill Inc. Weber (1975), aisló una cepa de S. glaucescens ETC-22794, la cual fué sobresaliente por su capacidad para producir Glucosa Isomerasa extracelular. Otra mutante de S. olivochromógenes, la cepa ATCC-21114, fué también la fuente de enzima utilizada para producir Jarabe de Maíz con Alto Contenido en Fructosa (Invertosa) para Corn Products (Godzicki, 1975).

Anheuser-Bush Inc., utilizó una cepa de Actinoplanes missouriensis, para producir Glucosa Isomerasa comercial. Este microorganismo es de los más potentes en la producción de la enzima (Shieh et al. 1974).

La lista es extensa, pero utilizando criterios muy selectivos, como los requerimientos de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales, pH y temperatura óptima de crecimiento, tiempo de máxima producción y por supuesto, actividad enzimática, se realizó una evaluación de los microorganismos disponibles para seleccionar la cepa que se adaptara más a nuestras necesidades, en base a los anteriores requerimientos.

Si se revisa la Tabla 6, en la cual, se agrupan la mayoría de los microorganismos productores de Glucosa Isomerasa, se puede ver que la actividad significativa de isomerasa está asociada consistentemente con la presencia de Xilosa ó Xilanos en el medio de crecimiento.

Tabla 6

CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE GLUCOSA ISOMERASA

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	pH	Temp. °C	Tiempo hi.	Rendimiento u/ml cultivo
<u>Actinoplanes missouriensis</u> NRRL-B-3342	Melaza de remolacha	Harina soya o *ACM+NaNO ₃	7.0	30	72	2.5 -35.2
<u>Aerobacter aerogenes</u>	Xilosa ó manosa	(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	28	48	-
<u>A. cloacae</u>	Xilosa	(NH ₄) ₂ HPO ₄	6.8	30	24	-
<u>A. levanicum</u>	Xilosa	Ex. de lev.	7.5	23	24	0.3
<u>Arthrobacter</u> NRRL B-3726,3727,3728	Glucosa	Ex. de lev. Ex. de car.	7.0	28	-	2.2 - 4.7
<u>Arthrobacter</u> NRRL B3728	Xilosa+ Glucosa	-	6.9	30	-	-
<u>Bacillus coagulans.</u> HN-68	Xilosa	Ex. de lev. + NH ₄ Cl	-	40	15	-
<u>Bacillus coagulans.</u> NRRL-5650 (mutante)	Glucosa	*ACM + (NH ₄) ₂ SO ₄	6.8	50	13	8.8
<u>Bacillus coagulans</u> NRRL-5649-66 (mutante)	Xilosa	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	60	-	-
<u>B. Stearothermophilus</u>	Xilosa	Peptona+*ACM Ex. de lev.	-	55	-	3.9 -12.9

*Agua de Cocimiento de Maíz

Tabla 6
(continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	pH	Temp. °C	Tiempo h.	Rendimiento u/ml cultivo
<u>Bacillus sp.</u> NRRL B-5350, 5351	Xilosa+ Glucosa	Peptona+ Caseína	-	38	17	-
<u>Corynebacterium candidus</u> ATCC-31261	Xilosa	Peptona	-	30	48	-
<u>Curtobacterium helvolum</u> NCLB-10352	Xilosa	Ex. de car. Ex. de lev.	-	30	24	-
<u>Escherichia intermedia</u>	Xilosa	NH ₄ Cl	-	28	20	-
<u>Flavobacterium arborescens</u>	Lactosa	Hidrolisado de proteína	-	30	72	-
<u>Lactobacillus brevis</u>	Xilosa	Peptona Ext. de lev.	-	37	18	-
<u>Microbispora rosea</u>	Xilosa Dextrinas	Ex. de lev. *A.C.M.	-	30	65	0.160
<u>Nocardia corallia</u>	Xilosa	Ex. de car. NH ₄ NO ₃	7.0	30	72	-
<u>N. dosovillei</u>	Xilosa Glucosa	*A.C.M.	-	30	-	0.400
<u>Paracolobactrum aerogenoides</u>	Glucosa	NH ₄ Cl	-	30	-	-

* Agua de Cocimiento de Maíz

Tabla 6
(continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	pH	Temp. °C	Tiempo hs.	Rendimiento u/ml cultivo
<u>Streptomyces</u> sp. S41-10	Hidrolis. ácida de Bagazo	Triptona Ex. de lev.	-	30	24 - 30	-
<u>Streptomyces</u> sp.	Xilosa	Triptona Ex. de lev.	7.0 7.2	30	96	1,10
<u>S. albus</u> YT-4	Salvado de trigo	*A.C.M.	-	30	30	2,57
<u>S. albus</u> YT-5	Xilosa ó Xilanos	*A.C.M.	-	30	20 - 24	2,8
<u>S. albus</u> YT-6	Salvado de trigo	*A.C.M.	-	45	20	1,94
<u>S. bikiniensis</u>	Xilosa ó Xilanos	Ex. de lev. Peptona	-	-	40	2,0
<u>S. bodiliae</u>	Xilosa ó Sorbitol	Polipeptona	-	30	20	-
<u>S. flavogriseus</u>	Hemice - lulosa	*A.C.M.	7.0	30	36	3,5
<u>S. flavovirens</u>	Xilanos	Polipeptona	-	30	-	-

* Agua de Cocimiento de Maíz

Tabla 6

(continuación)

Microorganismo	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	pH	Temp. °C	Tiempo h.	Rendimiento u/ml cultivo
<u>S. galbus</u>	Sorbitol + Gluc+Xil	*A.C.M.	7.0	28	40	3,7
<u>S. glaucescens</u>	Xil.+Glu. +Sorbitol	Ex. de lev.	-	30	46	2,2
<u>S. olivaceus</u> NRRL B-3916	Xilosa + Alm. Maíz	Peptona+ Ex. de lev.	7.0	-	-	2,9
<u>S. olivochromogenes</u> ATCC-2114	Xilosa + Alm. Papa	Peptona+ Ex. de carne	-	28	48	.20
<u>S. phaeochromogenes</u> SK	Xilosa	Peptona+ Ex. de lev.	-	29	24	5,56

*Agua de Cocimiento de Maíz
Fuente: (Wen Pin Chen, 1980).

La xilosa, es una pentosa, cuyo valor en el mercado la hace incosteable para ser utilizada como materia prima, en un medio de crecimiento a escala industrial.

Los xilanos, son polímeros de xilosa, los cuales se encuentran en forma más o menos abundante en materiales de deshecho como olo-tes de maíz, salvado de trigo y cáscara de maíz, ésto puede ser una alternativa, ya que los trabajos hechos por Takasaki, culminaron con la obtención de una enzima proveniente de un cultivo de Streptomyces albus, crecido en un medio conteniendo xilanos como fuente de carbono (Takasaki et al., 1969).

Otra característica sobresaliente de los datos presentados en la Tabla 6, es que varios de los microorganismos enlistados, requieren cobalto como uno de los minerales necesarios para su desarrollo, como es bien sabido, este ion genera problemas en seres humanos y animales, debido a la toxicidad del cobalto.

El género Arthrobacter, es uno de los pocos microorganismos productores de glucosa isomerasa, capaces de crecer en un medio de cultivo, donde la fuente de carbono es esencialmente glucosa (Lee, 1972). La cantidad de Glucosa Isomerasa producida es comparable y en muchos casos superior a la de los microorganismos crecidos en xilosa.

Los trabajos encabezados por Lee et al., llevaron al descubrimiento de tres mutantes constitutivas, las cuales crecían y producían la enzima en completa ausencia de xilosa y xilanos. Estas cepas fueron Arthrobacter novus sp. NRRL B-3726, NRRL B-3727, y NRRL B-3728. Dado que la enzima de estos microorganismos es constitutiva, su interés industrial aumenta considerablemente. Sin embargo, fue necesario considerar un medio de

crecimiento y producción, cuyas características sostuvieran un buen rendimiento tanto de biomasa como de la enzima. Al mismo tiempo se debió considerar el costo y disponibilidad, de cada uno de los nutrientes que forman el medio para producción, con el objeto de evaluar su posible escalamiento.

Las cepas de Arthrobacter obtenidas por Lee et al., fueron desarrolladas en medios nutritivos de grado reactivo, de ahí que, pensando en la producción industrial de la enzima, se deseó un medio que sustituyera a cada uno de los nutrientes originales, pero sin que afectara -- considerablemente la potencia enzimática.

De las diferentes materias primas que en los últimos años han sido de gran atractivo para la industria de fermentaciones, sobresale la melaza y el agua de cocimiento de maíz (Solomons, 1971). La primera, es un subproducto obtenido durante la fabricación de azúcar a partir de -- caña. El contenido de azúcares fermentables es suficiente para soportar el desarrollo de microorganismos a gran escala, y su costo en el mercado no es muy alto (~\$ 2.00/Kg). El agua de cocimiento de maíz, es un subproducto de la fabricación de glucosa y almidón, producido a partir de maíz. El proceso de obtención de dichos carbohidratos, determina que muchos -- minerales y material nitrogenado se extraigan del grano y posteriormente se incorporen al agua de cocimiento, lo que le permite ser utilizada como fuente de nitrógeno en medios de cultivo de grado industrial (Casida, - 1969).

En 1977, Shieh reportó un medio mejorado, para la producción de la glucosa isomerasa que contiene melazas y harina de soya. Anterior

mente, hay numerosos reportes, sobre la utilización del agua de cocimiento de maíz para la producción de otras moléculas (Takasaki 1969, Heady - 1973, Cejka 1976, Novo In. 1977 y Shieh 1977).

3) MATERIALES Y METODOS

3.1. Microorganismos y Medios de Cultivo

Las dos cepas utilizadas, fueron las mutantes constitutivas - de Arthrobacter novus sp. NRRL B-3726 y 3728.

Algunas características morfológicas, de las dos cepas empleadas en el presente trabajo son: bastones irregulares en forma y tamaño, generalmente de 0.5 a 0.7 micras de diámetro por 1.0 a 3.0 micras de longitud. Las células tienen un arreglo en forma de palizada. Pueden ser - rectas, curvadas o dobladas, frecuentemente unidas. Cuando los cultivos son viejos, se observan formas cocoides de 0.6 a 1.0 micras de diámetro. Si se transfiere a un medio fresco, las formas cocoides sufren cambios -- morfológicos, dando lugar a formas de bastón, los cuales son no-motiles. En cultivos jóvenes son gram-negativos, muchos de ellos con gránulos gram-positivos.

Los medios de cultivo evaluados para control, son los que a - continuación se describen:

a) Medio 1 ó de almacenamiento	
Dextrosa	0.5 % (p/v)
Extracto de carne	0.3
Bacto peptona	0.5
NaCl	0.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.01
pH final	6.5 - 7.0 (sin ajustar)
Agua destilada c.b.p.	100 ml

b) Medio 2 ó de crecimiento

	% (p/v)
Dextrosa	2.0
Extracto de carne	0.3
Extracto de levadura	0.15
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.6
KH_2PO_4	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
CaCl_2	0.01
pH final	6.9 (sin ajustar)
Agua destilada c.b.p.	100 ml

c) Medio 3 ó de producción de la enzima

	% (p/v)
Dextrosa	2.0
Extracto de carne	0.6
Extracto de levadura	0.15
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.6
KH_2PO_4	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
CaCl_2	0.01
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Todos los ingredientes de cada medio se esterilizaron juntos durante 30 minutos a 121°C de temperatura y 18 - 20 psig de presión, a menos que otra cosa se indique en el texto. El pH final después de esterilizar, era invariablemente de 7.0. Todos los reactivos para los medios de cultivo fueron obtenidos de Difco, S.A.

3.2. Metodología para el Cultivo de Arthrobacter

La metodología desarrollada para el cultivo de Arthrobacter se resume en la Fig. 2 y se explica a continuación.

3.2.1 Propagación de la Cepa Madre

Para la propagación de la cepa madre, se aislaron colonias - de Arthrobacter novus sp. en cajas de Petri, a partir de un tubo con -- agar nutritivo inclinado, con el objeto de tener colonias típicas. Poste riormente, cada colonia aislada fué resembrada en un tubo con agari nutritivo inclinado (medio 1), incubándose a 29°C durante 24 horas, después - de lo cual se almacenaban a una temperatura de 4°C, resembrándose cada - mes.

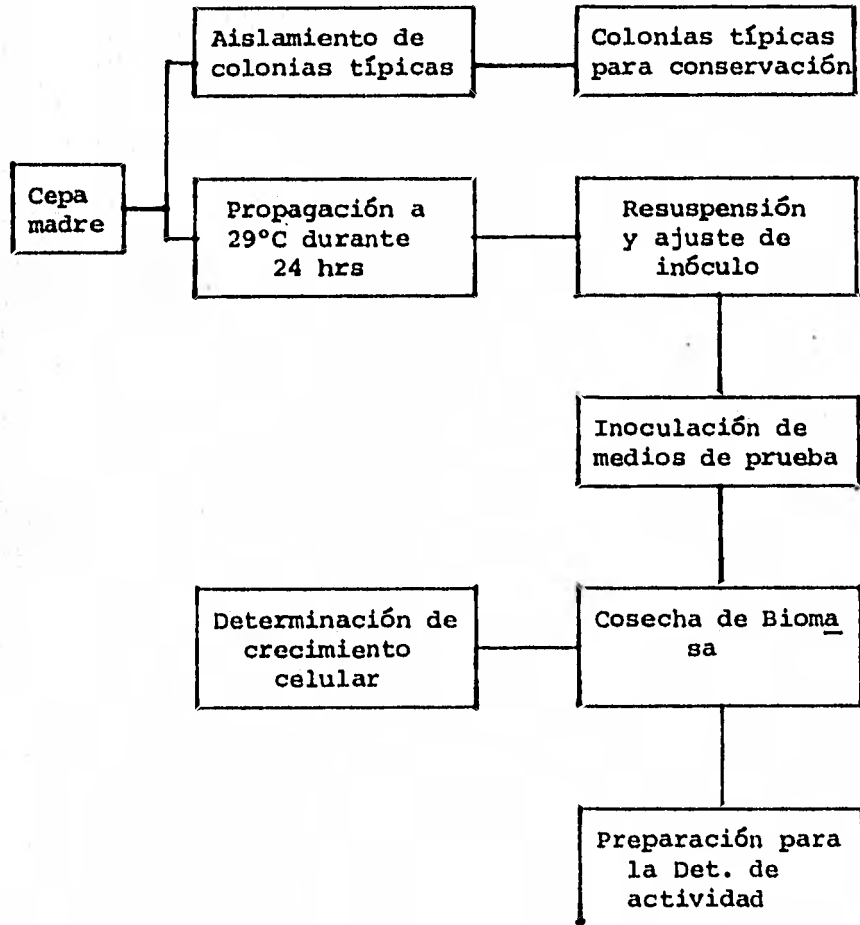
3.2.2. Preparación de Semilla para Crecimiento

De la cepa madre se resembraba a cajas Petri, conteniendo el medio 1. El inóculo se esparcía sobre toda la caja de manera que el mi croorganismo creciera uniformemente sobre la superficie del agar. Al -- igual que para la formación de la cepa madre, la semilla de crecimiento se incubaba a 29°C, durante 24 horas.

Posteriormente, se resuspendían las células de las capas Pe tri utilizando 10 ml de agua estéril. La resuspensión se realizaba con una asa previamente esterilizada, después de lo cual, se vertía el conte nido a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, para llevar a cabo el ajuste de - inóculo.

FIGURA 2

METODOLOGIA PARA EL CULTIVO DE Arthrobacter



3.2.3. Preparación y Concentración del Inóculo

El desarrollo celular, obtenido a las 24 horas de crecimiento y bajo las condiciones anteriormente señaladas, se ajustaba por densidad óptica, a 1.0 unidades, utilizando una longitud de onda de 540 nm. De -- ésta muestra ajustada, se utilizaban 5.0 ml como inóculo, de manera que -- la concentración final quedara al 5.0% (v/v). La solución empleada para diluir el inóculo, fue amortiguador de fosfato de potasio dibásico a una concentración de 0.1 M y pH de 7.0. Una vez inoculados, los matraces se incubaban a 29°C durante 24 horas y a 250 revoluciones por minuto, en una agitadora New Brunswick Scientific modelo G-10. Para inocular los medios de cultivo de prueba, también se siguió la misma metodología.

3.3. Cosecha de Biomasa

La biomasa resultante, después del tiempo señalado de fermen- tación (24 hrs.), se vertía en botellas de centrífuga de policarbonato de 250 ml, y se centrifugaban a 6,000 revoluciones por minuto, durante 15 minutos, a 4°C. El medio de cultivo se decantaba y se le medía el volu-- men final. El paquete celular obtenido, se resuspendía en buffer de fos-- fatos 0.05 M y pH de 7.0, y se centrifugaba nuevamente para efectuar un -- primer lavado, repitiéndose la operación una vez más, para efectuar un se- gundo lavado, bajo las condiciones arriba señaladas. Posteriormente, se decantaba el agua de lavado y las células se resuspendían en buffer de -- fosfatos 0.05 M y pH de 7.0, utilizando el menor volumen posible de buffer

(normalmente 20 ml), para concentrar la enzima. Este extracto de células, se utilizaba como fuente de enzima en los ensayos de actividad. En todos los casos se utilizó una centrífuga Sorval Dupont, modelo RC-5.

3.4. Determinación de Crecimiento Celular

El crecimiento celular, en los medios de grado reactivo, reportados por Lee et al., se determinó por el método turbidimétrico. Primeramente se midió la densidad óptica de los medios de cultivo antes de inocular, dicha lectura se consideró como blanco del medio y posteriormente se restó de las demás lecturas. Después de inocular, inmediatamente se tomó una muestra, a la cual se consideró como tiempo cero. A partir de ahí se fueron tomando muestras cada dos horas, hasta que se llegó a la fase estacionaria. Las muestras tomadas para densidad óptica, se diluían con amortiguador de fosfatos y se leían a 540 nm en un Colorímetro Bausch and Lomb, modelo S-20.

3.5. Determinación de Actividad Enzimática

Se utilizaron dos sistemas para medir la actividad enzimática:

Sistema 1

Glucosa 2 M	10.0 ml
*Suspensión celular	9.8 ml
MgCl ₂ 0.01 M	0.2 ml
Volumen total	20.0 ml
pH	6.8
Temperatura	65.0°C
Agitación	300.0 rpm.

Sistema 2

Fructosa 2 M	10.0 ml
*Suspensión celular	9.8 ml
MgCl ₂ 0.01 M	0.2 ml
Volumen total	20.0 ml
pH	6.8 ml
Temperatura	65.0°C
Agitación	300.0 rpm.

* La suspensión celular fué la fuente de enzima.

El proceso se iniciaba inmediatamente después de la cosecha de biomasa, tomando 9.8 ml de la suspensión celular, los cuales se preincubaban a 65°C. En la fase de preincubación, se adicionaban 0.2 ml, de una solución de MgCl₂ 0.01 M, iniciando la agitación a 200 rpm. El sustrato se preincubaba por separado, dentro del sistema que controlaba la temperatura a 65°C. Después de 5 minutos de preincubación, se tomaban 10.0 ml del sustrato y se vertían al recipiente que contenía la enzima, y simultáneamente se disparaba un cronómetro, para medir los tiempos en que se irían tomando alícuotas de 2.0 ml a los tiempos de 0', 3', 6' y 9 minutos. Estas alícuotas se depositaban en un tubo que contenía 10.0 ml de ácido perclórico 0.1 M, y se agitaban inmediatamente en un Vortex-Genie Modelo K-55-G. De éstos tubos, se tomaban las alícuotas respectivas para posteriormente efectuar la determinación colorimétrica de fructosa ó glucosa.

3.6. Determinación Colorimétrica de D-fructosa

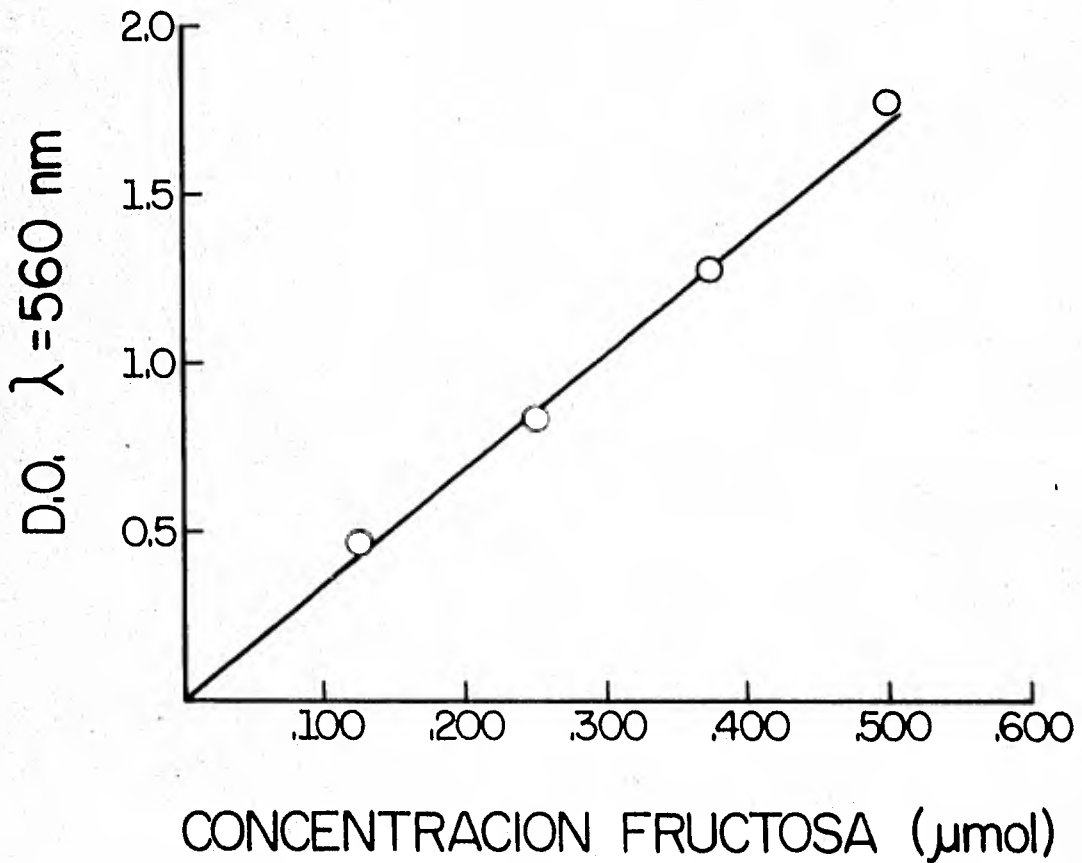
Para la medida de la actividad enzimática producida en cada ensayo, a cada muestra tomada después de la reacción de actividad, se le de terminaba la concentración de D-fructosa por el método de Cisteína-Carbazol, descrito por Dische y Borenfreund (1951), para lo cual, a una alícuota de 0.1 ml se le adicionaba 0.4 ml de agua destilada, más 0.1 ml de Cisteína al 2.5% en agua. Los tubos con la muestra se preincubaban a -- 30°C durante dos minutos, posteriormente se adicionaban 3.0 ml de una so lución de ácido sulfúrico al 80%, previamente mezclado con una solución de Carbazol al 0.4% en alcohol etílico (grado reactivo), con una relación ácido-carbazol de 100:1. Las muestras se incubaban a 30°C durante 30 mi nutos, e inmediatamente se leía densidad óptica a 560 nm en un colorímetro Bausch and Lomb, modelo S-20.

Para determinar la cantidad de fructosa obtenida, se calculaba un factor de conversión, en base a tres estándares que se medían simultá neamente con las muestras problema.. Dichos estándares se tomaban de -- una solución de fructosa 0.5 M, cuyos valores se graficaban en una curva de concentración de fructosa contra densidad óptica a 560 nm (Fig. 3).

3.7. Determinación Colorimétrica de D-glucosa

Se utilizó el método de Glucosa Oxidasa reportado por Werner, Ray y Wielenger (1970), cuyos reactivos se venden comercialmente y endonde se utilizan dos soluciones diferentes; la número 1, es un estándar que contiene 9.1 mg de glucosa/100 ml., y, la solución 2, que contienen 100 mM de amoru

FIG. 3
CURVA ESTANDAR DE FRUCTOSA METODO DE
CISTEINA CARBAZOL



tiguador de fosfato; pH = 7.0; 20 microgramos de POD/ml (Peroxidasa); 180 - microgramos de GOD/ml (Glucosa Oxidasa) y 1.0 mg de cromógeno ABTS/ml -- (2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolin-sulfónico-(6) diamonio. La solución dos, se diluye en 1000 ml de agua bidestilada. Después de hacer las diluciones adecuadas de las muestras problema, se vierten 5.0 ml de la solución 2 en 0.1 ml del problema, se mezclan, se dejan en reposo a temperatura ambiente y después de 30 minutos y no más de 50 se leen las densidades ópticas a 620 - 660 nm, en un colorímetro del mismo modelo que el anterior. Asimismo, se trazó una curva estándar de densidad óptica contra concentración de glucosa (Fig. 4), para determinar intervalo de lecturas y los cálculos de las muestras problema.

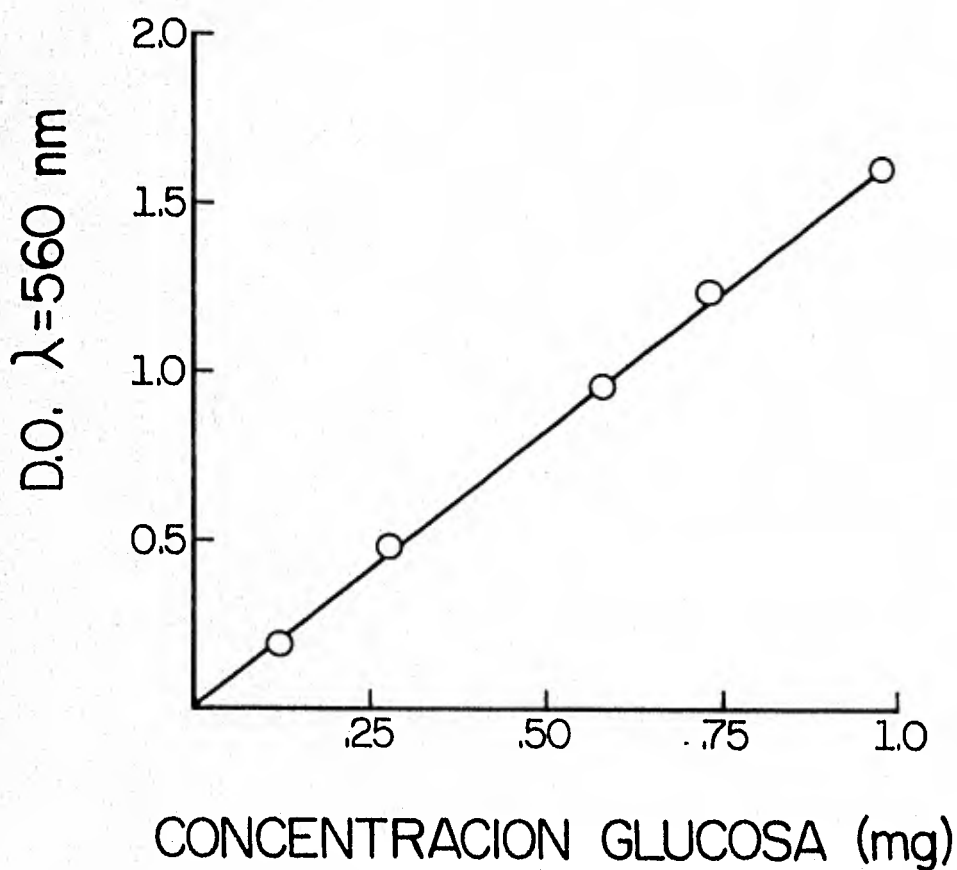
3.8. Método de Lisis Celular

La inducción de lisis celular, se llevó a cabo según el método reportado por Sipos et al. (1973). Dicho método consistió en utilizar 340 mg de biomasa, cultivada y cosechada de acuerdo como se describió anteriormente. La cantidad de biomasa señalada, se resuspendió en 17.5 ml de buffer de fosfato de potasio 0.05 M a pH = 7.0, más EDTA 0.005 M. Al buffer de fosfatos previamente se le habían agregado 0.60 mg de lisozima y 0.30 ml de tolueno.

Esta mezcla se dejó incubar durante 20 horas a 20°C después de lo cual, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos y a 4°C.

Se recuperaron 15 ml de sobrenadante, al cual, posteriormente se le midió actividad enzimática, así como el resto del paquete celular.

FIG. 4
CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA METODO
DE GLUCOSA OXIDASA



4) RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Selección de la Cepa de Trabajo y Ensayo de Ruptura Celular

En el momento de iniciar éste trabajo, se contaba con dos cepas de Arthrobacter novus sp., éstas fueron las mutantes 3726 y 3728, las cuales están reportadas en la literatura como de las que tienen mayor potencial industrial (Bucke, 1977), ya que producen una enzima con alto poder de isomerización. Con el fin de seleccionar a la cepa con la que se probarían los diferentes medios de cultivo, se procedió a evaluar tanto su viabilidad como la actividad enzimática que en ese momento poseían, -- para de ahí partir hacia la evaluación de los medios de cultivo reportados en la literatura para estas cepas, con el objeto de seleccionar a una de ellas como control, y, eventualmente introducir modificaciones que pudieran reportarnos datos de crecimiento y actividad constantes y aún mayores. Posteriormente, se irían sustituyendo en el medio de cultivo seleccionado, cada uno de los nutrientes base por materias primas de grado industrial. Para tal fin, se hicieron crecer ambas cepas en el medio de -- cultivo reportado por Lee et al., para la producción de la enzima, (medio 3) y los resultados se enlistan en la Tabla 7, donde se puede ver que se analizaron tanto el paquete celular como el sobrenadante de ambas cepas, ya que, a pesar de que la enzima de Arthrobacter es intracelular, se tienen casos de microorganismos cuya enzima es liberada por lisis, debido a que hay autólisis y ésta se puede ver favorecida por las manipulaciones durante la cosecha (Hyzuka 1973, Wen Pin Chen 1980).

Tabla 7

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE DOS CEPAS DE Arthrobacter

<u>Arthrobacter novus</u> NRRL B-3726	Actividad enzimática micromol F/min *u/ml	
Sobrenadante	17.5	0.17
Suspensión de células	94.6	0.94
<u>Arthrobacter novus</u> NRRL B-3728		
Sobrenadante	14.0	0.14
Suspensión de células	76.7	0.76

*Una unidad de actividad de glucosa isomera
sa, es la cantidad de enzima que produce -
una micromol de D-fructosa por minuto, en
las condiciones de ensayo definidas en Ma-
teriales y Métodos.

Como los resultados lo demuestran, la mayor parte de actividad enzimática se encuentra intracelularmente, siendo 84.8% y 84.4%, y solo se encontró 15.2% y 15.6% de actividad enzimática extracelular para las cepas 3726 y 3728 respectivamente.

Con el fin de recuperar una mayor actividad enzimática en ambas cepas, se decidió evaluar un método convencional de lisis celular. Para lo cual se utilizó el método de ruptura reportado por Sipos (1973), Suekane (1974) e Hirota (1977) y descrito en Materiales y Métodos.

De los datos reportados en la Tabla 8, se puede concluir -- que hubo inducción de lisis celular, ya que se obtiene entre el 26 - 30% de actividad enzimática por mililitro de caldo en el sobrenadante de ambas cepas. Puesto que el método de lisis empleado, es de los más sencillos para utilizarse a nivel de laboratorio, y ya que no hubo lisis -- completa, se decidió seguir utilizando el paquete celular como fuente de enzima en los siguientes ensayos de actividad, y no utilizar el método de lisis celular.

Tomando en cuenta la reproducibilidad de los datos obtenidos hasta ese momento, se decidió utilizar la actividad enzimática en unidades producidas por mililitro de caldo de cultivo, como el parámetro decisivo en la elección de la cepa de trabajo, además de que dichas unidades son utilizadas por la mayoría de los autores (Bucke 1977), por lo que se podría establecer un punto de comparación entre los resultados obtenidos y los reportados en la literatura.

Tabla 8

INDUCCION DE LISIS CELULAR CON TOLUENO
Y LISOZIMA DE LAS CEPAS 3726 Y 3728

<u>Arthrobacter novus</u> NRRL B-3726	Actividad enzimática	
	micromol F/min	u/ml
Sobrenadante	35.7	0.35
Extracto celular	85.3	0.84
<u>Arthrobacter novus</u> NRRL B-3728	Actividad enzimática	
	micromol F/min	u/ml
Sobrenadante	24.6	0.24
Extracto celular	71.2	0.70

Este fué, por lo tanto, el criterio para elegir a la cepa de Arthrobacter novus sp. NRRL B-3726, como el microorganismo de trabajo en los siguientes ensayos, ya que su actividad fué superior en 19% con respecto a la otra cepa.

4.2. Evaluación de los Medios de Cultivo de Grado Reactivo

En la patente de Lee et al., se describen tres medios de cultivo, los cuales son utilizados de diferente manera; así se tiene que hay un medio de cultivo para conservación de la cepa (Medio 1), un medio de crecimiento (Medio 2) y finalmente, un medio de cultivo para producción de la enzima (Medio 3).

Dado que el objetivo principal de este trabajo es la sustitución de éstos medios, se decidió evaluar cada uno de ellos, con el fin de seleccionar a uno como control, utilizando los siguientes parámetros de decisión:

- 1) Tiempo de máximo crecimiento
- 2) Actividad enzimática

Hay que señalar, que las diferencias en cuanto a la composición de los medios de cultivo eran más notables entre el 1 con respecto al 2 y 3, que el 2 con respecto al 3 (Ver descripción de los medios en Materiales y Métodos).

Como era de esperarse, en el medio de cultivo 1 se tiene menos crecimiento, ya que contiene menor concentración de glucosa (0.5%), además de que no contiene fosfato dibásico de amonio, ni fosfato monobásico de -

potasio, a la primera de éstas sales se le considera como fuente de nitrógeno inorgánico, lo que le adjudica un papel enriquecedor de la fuente de nitrógeno en los medios de cultivo 2 y 3, lo cual se confirma con su mayor crecimiento en estos medios (Fig. 5), pero sin embargo, no afecta favorablemente la actividad enzimática (Tabla 9). Aunque en el medio 1 se obtuvo el menor crecimiento, tal comportamiento no evitó que en ese medio se encontrara la mayor actividad (1.19 u/ml), siendo menor en el medio de cultivo 2 (1.12 u/ml) y la más baja en el medio de cultivo 3 (0.98 u/ml).

Cabe hacer notar, que en estos ensayos, la baja actividad obtenida (aproximadamente 3 veces menos de la reportada en la literatura, - (Brucke 1977), se debió a que el tiempo de incubación, durante la fermentación fué de 16 hrs, ya que en ese tiempo se obtuvo el máximo de crecimiento.

En virtud de que en los medio de cultivo señalados como de -- mayor producción enzimática; esta resultaba baja, a pesar de que la enzima de este microorganismo es constitutiva, se pensó en la posibilidad de que hubiera represión catabólica por la alta concentración de glucosa y los -- tiempos relativamente cortos de fermentación, por lo que se aumentó la concentración de glucosa en el medio 1 a 2% y se disminuyó en los medios 2 y 3 a 0.5%.

Los resultados de tal modificación para el crecimiento celular, están descritos en la Figura 6, donde se puede ver que hay una elevación de la pendiente en la curva de crecimiento del medio 1, mientras que

Tabla 9

EVALUACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
DE GRADO REACTIVO

Medio 1 (%)		Actividad enzimática micromol F/min u/ml	
Glucosa	0.5	121.13	1.19
Ex. carne	0.3		
Peptona	0.5		
NaCl	0.8		
MgSO ₄	0.01		
Medio 2 (%)			
Glucosa	2.0	113.4	1.12
Ex. carne	0.3		
Ex. lev.	0.15		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
KH ₂ PO ₄	0.2		
MgSO ₄	0.01		
Medio 3 (%)			
Glucosa	2.0	98.7	0.98
Ex. carne	0.6		
Ex. lev.	0.15		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
KH ₂ PO ₄	0.2		
MgSO ₄	0.01		

FIG. 5
CRECIMIENTO CELULAR DE ARTHROBACTER NOVUS SP.
NRLL B-3726 EN TRES MEDIOS DE CULTIVO DE GRADO
REACTIVO

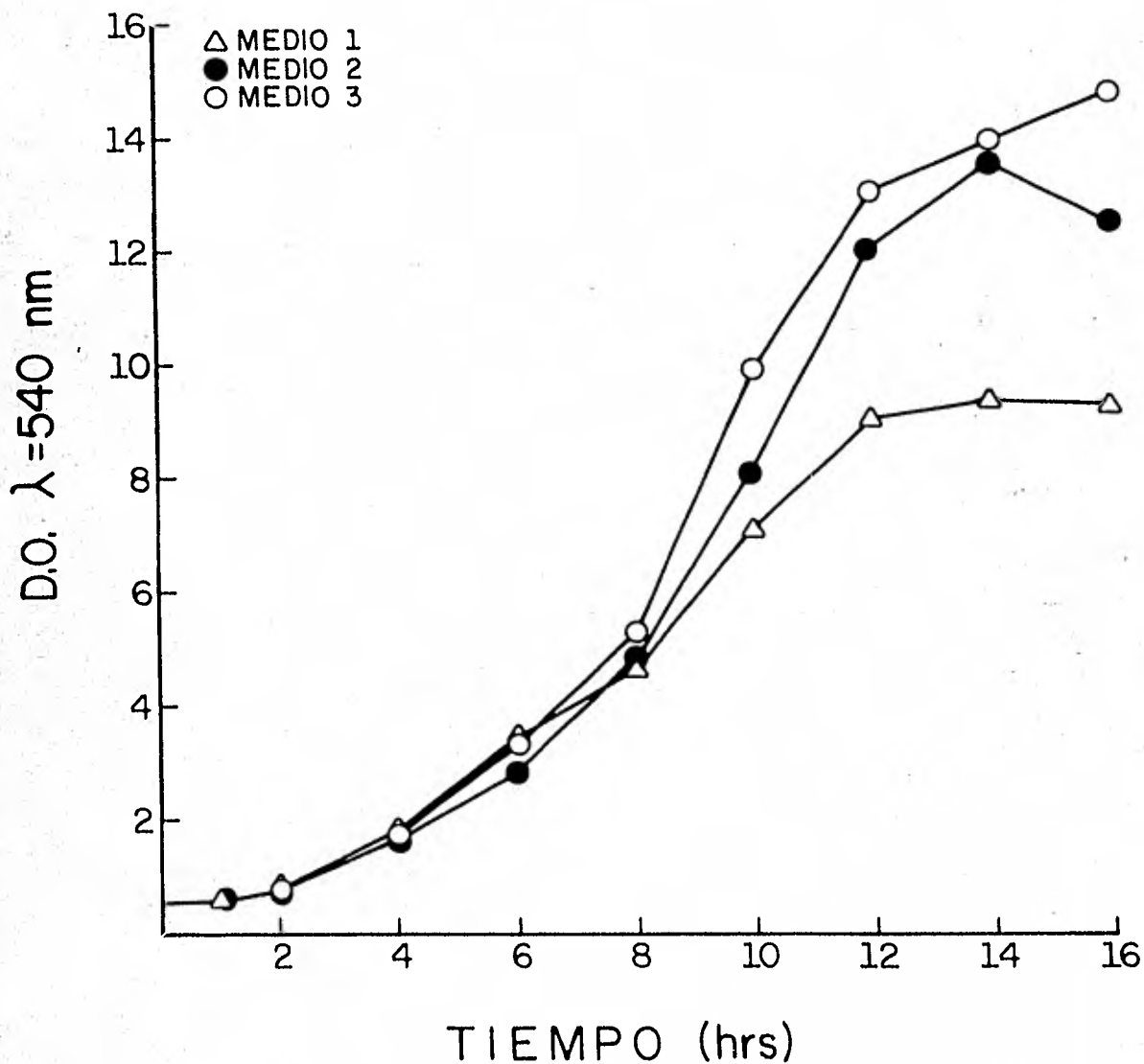
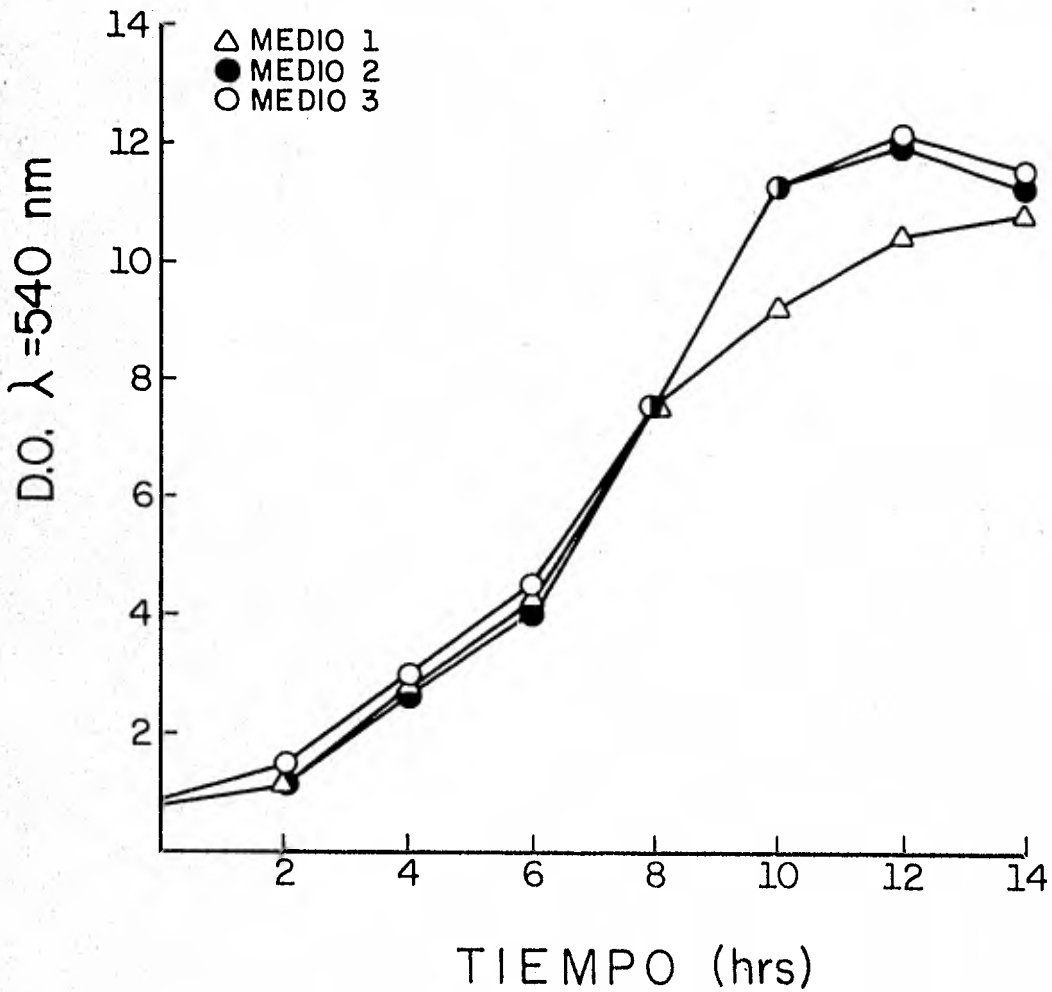


FIG. 8
CRECIMIENTO CELULAR DE ARTHROBACTER NOVUS SP.
NRRL B-3726 EN TRES MEDIOS DE CULTIVO DE GRADO
REACTIVO



las curvas de crecimiento de los medios de cultivo 2 y 3 permanecen esencialmente igual.

La actividad enzimática continuó siendo mayor en el medio 1 - (1.28 u/ml), y solo se notó un ligero aumento de la misma, con respecto al anterior ensayo, en los medios de cultivo 2 y 3 (1.15 y 1.01 u/ml respectivamente), Tabla 10.

De acuerdo con estos resultados, se eligió al medio de cultivo 1 formado por: glucosa 0.5%, extracto de carne 0.3%, peptona 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01% y NaCl 0.8%, como el medio de cultivo para ser utilizado como control en los ensayos que restan. Cabe señalar el hecho de que el medio 1 careciera de fosfato dibásico de amonio y de fosfato monobásico de potasio, ya que se tendría un medio menos complejo.

Por otro lado, aunque se aumentó en 4 veces la concentración de glucosa en el medio 1 (en el cual se encontró la mayor actividad), este procedimiento no resultó benéfico, para que aumentara la actividad enzimática.

4.3. Efecto de la Forma de Esterilización de los Medios de Cultivo y del Lavado Celular sobre la Actividad Enzimática

Es frecuente que durante la formulación y esterilización del medio de cultivo, no se tome en cuenta la posible reactividad de los nutrientes. Este es el caso de la interacción entre aminoácidos y azúcares, que dan por resultado la formación de compuestos difíciles de utilizar por los microorganismos. Dicha interacción se conoce comúnmente como Reacción de Maillard (Reed, 1975).

Tabla 10

EVALUACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
DE GRADO REACTIVO

Medio 1 (%)		Actividad enzimática micromol F/min u/ml	
Glucosa	2.0	129.8	1.28
Ex. carne	0.3		
Peptona	0.5		
NaCl	0.8		
MgSO ₄	0.01		
Medio 2 (%)			
Glucosa	0.5	115.9	1.15
Ex. carne	0.3		
Ex. lev.	0.15		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
KH ₂ PO ₄	0.2		
MgSO ₄	0.01		
Medio 3 (%)			
Glucosa	0.5	103.0	1.01
Ex. carne	0.6		
Ex. lev.	0.15		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
KH ₂ PO ₄	0.2		
MgSO ₄	0.01		

Se decidió cuidar éste aspecto, llevando a cabo la esterilización de la fuente de carbono y las fuentes de nitrógeno por separado. Así como también, se evitó la lisis celular al máximo, para lo cual se cambió el agua destilada y se utilizó un amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M a pH 7.0, durante la fase de resuspensión y lavado celular.

Este procedimiento permitió aumentar la actividad hasta en un 27% (Tabla 11). Se puede observar que el efecto real está dado por la separación de los nutrientes durante la esterilización, ya que cuando se utilizó amortiguador de fosfatos para el lavado el aumento en la actividad -- fué de solo el 4.2%.

4.4. Efecto de Diferentes Tipos de Agua sobre la Actividad Enzimática

Otra consideración importante, dentro de las modificaciones -- hechas al medio de cultivo seleccionado como control, fué verificar el -- efecto de la utilización del agua destilada y la sustitución de ésta por -- agua potable, que es la usualmente utilizada en los medios de cultivo para fermentaciones industriales. La importancia que se atribuyó a este hecho radicó en que muchas veces, algunos elementos traza y/o factores de crecimiento, son precisamente suministrados por el agua (Calam 1967). En la -- Tabla 12, se puede ver que hay un incremento notorio en la actividad enzimática, cuando se utilizó agua no destilada (2.11 u/ml), con respecto al -- control (1.76 u/ml). Sin embargo, cuando se enriquecieron, tanto el agua destilada como el agua no destilada con CaCl_2 0.01%, se incrementó aún más la actividad enzimática (2.13 y 2.18 u/ml respectivamente), lo cual concuer

Tabla 11

EFFECTO DE LA ESTERILIZACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
Y LAVADO CELULAR SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Tratamiento	Actividad enzimática micromol F/min u/ml	
Esterilización de nutrientes juntos. Células lavadas con agua. (control).	117.0	1.18
Esterilización de nutrientes por separado. Células lava- das con agua.	148.7	1.40
Esterilización de nutrientes juntos. Células lavadas con buffer fosfatos 0.05 M.	121.9	1.23
Esterilización de nutrientes por separado. Células lava- das con Buffer Fosfatos 0.05 M	159.3	1.50

Tabla 12

EFFECTO DEL AGUA Y LAS SALES DE CALCIO
Y SODIO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Agua utilizada en el medio de cultivo	Actividad enzimática micromol F/min u/ml	
Agua destilada (control)	166.3	1.76
Agua deionizada	148.4	1.55
Agua no destilada	206.3	2.11
Agua destilada + CaCl ₂ 0.01%	210.3	2.13
Agua no destilada + CaCl ₂ 0.01%	240.5	2.18
Agua destilada + Na ₂ HPO ₄ 0.05 M	153.6	1.63
Agua no destilada + Na ₂ HPO ₄ 0.05 M	165.0	1.78

Medio de cultivo: 1

Tiempo de incubación: 24 hrs.

Inóculos: 5%

da con lo reportado por algunos autores, sobre la necesidad de la complementación del medio de cultivo para Arthrobacter con iones divalentes como el calcio (Meers 1976, Yoshimura 1966). Por otra parte, se ha reportado también que iones monovalentes como el Sodio y el Potasio, afectan positivamente la actividad enzimática (Lee 1972, Suekane 1974). Pero aunque se utilizó fosfato disódico, tanto en el medio con agua destilada como en el medio con agua no destilada, la actividad obtenida no fué relevante (1.63 y 1.78 u/ml respectivamente). De acuerdo a este experimento, se decidió utilizar agua no destilada (potable) y enriquecida con CaCl_2 0.01% en lo que resta de los ensayos. Cabe señalar, que el aumento de actividad enzimática en el control, se debió a que el tiempo de incubación fué de 24 -- horas. Si se asume que hubo el mismo efecto en todos los demás medios, -- el aumento neto de actividad, fué de aproximadamente 17%.

4.5. Evaluación del Método de Glucosa Oxidasa para Determinación de la Actividad Enzimática de Glucosa Isomerasa

Antes de entrar de lleno a la evaluación de las diferentes -- materias primas que se debían probar, se hizo necesario considerar un -- método de determinación cuantitativa de la actividad enzimática que fue-- ra expedito y que . . . reprodujera lo más exacto posible los resultados que hasta ese momento se habían obtenido. En el método de glucosa oxidasa, -- se utiliza a esta enzima para cuantificar los niveles de glucosa en la --

sangre. Dada la alta especificidad del método, se pensó que aumentaría la precisión del mismo, además de que se ahorraría tiempo en la determinación.

Pero antes de adoptar esta técnica, se decidió evaluar, -- efectuando ensayos de actividad utilizando el control (agua destilada), del experimento anterior (Tabla 12) y comparar los resultados con los obtenidos por el método de cisteína-carbazol.

Con fundamento en el promedio de los resultados obtenidos y agrupados en la Tabla 13, donde se puede observar que utilizando la técnica de glucosa oxidasa, se obtienen valores de actividad cuyo orden de -- magnitud es equivalente a los obtenidos por el método de cisteína carbazol, se decidió utilizar el método de glucosa oxidasa en los ensayos -- que restan.

4.6.. Efecto de la Fuente de Carbono sobre la Actividad de Glucosa Isomerasa

Las diferentes fuentes de carbono de grado industrial que se evaluaron para sustituir a la glucosa de grado reactivo, considerando su disponibilidad se agrupan en la Tabla 14.

Debido al alto porcentaje de sólidos en la melaza, se le -- aplicó un tratamiento de filtración y ajuste de pH, obteniéndose un producto al que se le llamó Melaza Clarificada, que también se evaluó como fuente de carbono.

Tabla 13

EVALUACION DEL METODO DE GLUCOSA OXIDASA
PARA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
DE GLUCOSA ISOMERASA

	Actividad enzimática	
	<u>umol F/min</u>	<u>u/ml</u>
Método de Cisteína- Carbazol	179	1.80
	<u>umol G/min</u>	<u>u/ml</u>
Método de Glucosa- Oxidasa	177	1.79

Tabla 14

FUENTES DE CARBONO PRBADAS PARA LA
FORMULACION DEL MEDIO DE PRODUCCION
DE GLUCOSA ISOMERASA

Materia prima	*Contenido en glucosa
Melaza	50%
Glucosa Industrial	50%
Glucosa Anhidra	~ 100%

*Según especificaciones del pro--
veedor.

Tanto a las melazas como a la glucosa industrial se les determinó el % de sólidos, por lo que se realizó un ajuste en la concentración utilizada en el medio de cultivo, aumentándose de 0.5% a 1.0%.

Los reportes que se tienen sobre el contenido de azúcares totales de la melaza, le adjudican de 48% a 58% (30% de sacarosa y 22% de azúcar invertido), (Solomons 1971, Casida 1969). Cuando se utiliza melaza como componente de un medio de fermentación, se considera que contiene el 50% de azúcares fermentables, por lo que se realizó un segundo ajuste en la concentración utilizada en el medio de cultivo de 1.0% a 2.0%, para igualar el contenido de glucosa en los diferentes medios.

De los resultados obtenidos en la Tabla 15, se pueden seleccionar melaza y glucosa industrial como sustitutos de la glucosa de grado reactivo, ya que se obtuvieron 1.72 y 1.90 u/ml respectivamente, sin embargo, el costo por kilo de la melaza es 10 veces menor al de la glucosa industrial, y, tomando en cuenta que la diferencia en actividad catalítica, entre éstas dos fuentes, no fué relevante, se eligió a la melaza, como la materia prima que sustituiría a la glucosa de grado reactivo.

Los resultados de actividad obtenidos con la melaza clarificada, fueron de 0.58 u/ml, lo que representa un valor muy bajo, posiblemente porque durante el proceso de clarificación se perdieron algunos nutrientes importantes.

4.7. Efecto de la Fuente de Nitrógeno en el Medio

En el medio de cultivo descrito por Lee et al., se utilizan

Tabla 15

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA
ACTIVIDAD DE GLUCOSA ISOMERASA

Fuente de carbón (%)		Actividad enzimática micromol G/min u/ml	
Glucosa (control)	0.5	193.0	2.05
Melaza clarificada	2.0	52.0	0.58
Melaza	2.0	147.6	1.72
Glucosa industrial	1.0	172.8	1.90
Glucosa anhidra	0.5	132.9	1.46

Medio de cultivo: 1
Tiempo de fermentación: 24 hrs.
Inóculo: 5%

dos fuentes de nitrógeno: extracto de carne y peptona, al 0.3% y 0.5% respectivamente. En la Tabla 16, se puede observar que se tenían varias fuentes de nitrógeno para evaluar, como sustitutos del extracto de carne y de la peptona. La estrategia seguida tuvo como finalidad evaluar su influencia en la producción y en la actividad de la enzima, haciendo interaccionar la fuente de nitrógeno de prueba con la fuente de carbono de cuatro maneras diferentes:

- 1) Una fuente de nitrógeno de prueba con la fuente de carbono de grado reactivo.
- 2) Una fuente de nitrógeno de prueba con la fuente de carbono seleccionada como sustituto (Melaza).
- 3) La introducción de dos fuentes de nitrógeno de prueba, interaccionando con la fuente de carbono de grado reactivo.
- 4) La introducción de dos fuentes de nitrógeno de prueba, interaccionando con Melaza.

4.7.1. Efecto de la Interacción de la Fuente de Nitrógeno de Prueba con la Fuente de Carbono de Grado Reactivo

Dado que había que sustituir dos fuentes de nitrógeno, cuya contribución en la producción de glucosa isomerasa era complementaria, se buscó que las materias primas que fueran a sustituir a la peptona y al extracto de carne de grado reactivo, fueran de composición semejante, para lo cual se evaluó su influencia en la actividad, utilizando solamente una de dichas fuentes, interaccionando con glucosa de grado reactivo.

Tabla 16

FUENTES DE NITROGENO PROBADAS PARA LA
FORMULACION DEL MEDIO DE PRODUCCION DE
GLUCOSA ISOMERASA

Materia prima	*Contenido protéico %
Harina de soya	49
Harina de pescado	55
Harina de carne	45
Peptona industrial	80
Caseinato de calcio	80-90
Caseinato de sodio	80-90
Proteína vegetal h.	20
Autolisado de lev.	28-30
Leche de soya	28
Agua de cocimiento de de maíz	56

*Base seca

Como se puede ver en los resultados que se resumen en la Tabla 17, la más alta actividad obtenida (1.26 u/ml), fué cuando se utilizó caseinato de sodio (0.5%), junto con extracto de carne (0.3%). Aunque, - la actividad obtenida con agua de cocimiento de maíz (1.0%) y extracto de carne (0.3%) fué digna de tomarse en cuenta (1.19 u/ml), éstos valores -- son bajos comparados con el control (2.13 u/ml), pero se esperaba que la actividad aumentara en los medios 3 y 4 de dicha tabla, cuando se sustituyera la otra fuente de nitrógeno.

Todas las demás fuentes de nitrógeno evaluadas (harina de carne 0.3%, harina de pescado 0.3%, peptona industrial 0.5% y harina de soya 0.3%), produjeron una actividad que va de 0.12 a 0.70 u/ml.

Se puede ver también en la misma tabla, que en todos los me-- dios donde se utilizó peptona, tanto reactiva como industrial, la activi- dad catalítica es más baja que en el control, ésto fué sorprendente, ya - que éste nutriente tiene un contenido protéico de 80 - 90%, pero aparente mente, no solo el contenido protéico determina que haya un buen rendimien to de enzima, sino que la interacción de áquel con los demás nutrientes, constituye un aspecto importante para esperar una alta actividad.

4.7.2. Efecto de la Interacción de Diferentes Fuentes de Nitrógeno con Melaza

Como se puede ver en la Tabla 18, se evaluaron siete diferen- tes medios de cultivo, donde se hizo interaccionar melaza con diferentes fuentes de nitrógeno.

Tabla 17

EVALUACION DE UNA FUENTE DE NITROGENO DE
PRUEBA CON LA FUENTE DE CARBONO DE GRADO R.

Medio	Fuente de nitrógeno	(%)	Actividad enzimática micromol G/min u/ml	
1	Peptona Ex. carne (control)	0.5 0.3	207.0	2.13
2	Peptona Ind. Ex. carne	0.5 0.3	66.6	0.66
3	Licor maíz Ex. carne	1.0 0.3	111.8	1.19
4	Caseinato Ex. carne	0.5 0.3	120.8	1.26
5	Peptona H. carne	0.5 0.3	11.6	0.12
6	Peptona H. soya	0.5 0.3	71.2	0.70
7	Peptona H. de pes.	0.5 0.3	32.6	0.33

Todos los medios fueron complementados con:
glucosa (0.5%), NaCl (0.8%) y MgSO₄ (0.01%).

Tabla 18

EFFECTO DE LA INTERACCION DE DIFERENTES FUENTES DE
NITROGENO CON MELAZA

Medio	Fuente de carbono y nitrógeno (%)	Actividad enzimática micromol G/min u/ml
1	Glucosa 0.5 Peptona 0.5 Ex. carne 0.3 (control)	216.2 2.14
2	Melaza 2.0 Peptona 0.5 Ex. carne 0.3	139.5 1.45
3	Melaza 2.0 H. soya 1.0	12.6 0.13
4	Melaza 2.0 H. soy. Int. 1.0	11.7 0.13
5	Melaza 2.0 Leche soya 1.0	14.0 0.14
6	Melaza 2.0 Licor maíz 1.0	25.6 0.28
7	Melaza 2.0 Caseinato 0.5	120.7 1.30

Todos los medios fueron complementados con: NaCl (0.8%), $MgSO_4$ (0.01%) y Peptona de grado R. (0.5%).

El medio de cultivo 7, preparado con Melaza (2.0%) y caseinato de sodio (0.5%), fué el que produjo mayor actividad enzimática por mililitro de caldo de cultivo (1.30) contra 2.14 u/ml del control (medio 1), sin embargo, hay que hacer notar que éste medio tenía dos fuentes de nitrógeno (Peptona 0.5% y Ex. de carne 0.3%).

Resulta interesante que el medio de cultivo formado por melaza (2.0%), peptona (0.5%) y ex. de carne (0.3%), éstas últimas, de grado reactivo, hayan producido similar actividad que el medio de cultivo 7, - donde la fuente de nitrógeno no es de grado reactivo, lo cual daba la pauta para buscar una fuente de nitrógeno que complementara al caseinato de sodio del medio 7, para elevar la actividad enzimática.

Todas las demás fuentes de nitrógeno probadas, no resultaron eficientes, ya que la actividad enzimática encontrada, se situó en el intervalo de 0.13 a 0.28 u/ml. Esta última actividad fué obtenida en el medio de cultivo 6, el cual estaba formado por melaza (2.0%) y agua de cocimiento de maíz (1.0%), y aunque la actividad obtenida utilizando éste último nutriente fué baja, era factible esperar un aumento de la misma si se complementaba el medio de cultivo con otro nutriente que enriqueciera la fuente de nitrógeno.

4.7.3 Efecto de la Interacción de dos Fuentes de Nitrógeno con Glucosa de Grado R

Los datos que se agrupan en la Tabla 19, indican que en el medio 2, cuya fuente de nitrógeno está formada por caseinato de sodio (0.5%) y agua de cocimiento de maíz (1.0%), se producen 1.46 u/ml, lo --

Tabla 19

EVALUACION DE DOS FUENTES DE NITROGENO
INTERACCIONANDO CON GLUCOSA DE GRADO R

Medio	Fuente de carbono y nitrógeno (%)	Actividad enzimática micromol G/min u/ml
1	Glucosa 0.5 Peptona 0.5 Ex. carne 0.3	210.8 2.18
2	Glucosa 0.5 Licor maíz 1.0 Caseinato 0.5	142.6 1.46
3	Glucosa 0.5 Licor maíz 1.0 Peptona ind. 0.5	92.7 0.92
4	Glucosa 0.5 Licor maíz 1.0 H. de carne 0.3	60.9 0.65
5	Glucosa 0.5 Caseinato 0.5 Peptona ind. 0.5	80.6 0.81
6	Glucosa 0.5 Caseinato 0.5 H. de carne 0.3	127.0 1.33
7	Glucosa 0.5 Peptona ind. 0.5 H. de pescado 0.3	36.8 0.38

cual representa el 66.9% con respecto al control (2.18 u/ml), solo el medio de cultivo 6 produjo una actividad (1.33 u/ml) cercana al medio 2.

Como se puede notar en los resultados de actividad de todos los demás medios, la producción de la enzima se situó en valores muy bajos. Pero lo más sorprendente es que un medio aparentemente rico en fuente de nitrógeno como al medio 5, formado por caseinato de sodio (0.5%) y peptona industrial (0.3%), haya producido solo 0.81 u/ml de actividad -- enzimática. Lo que permitiría pensar que éstas fuentes de nitrógeno ó -- carecen de factores de crecimiento ó aunque el contenido protéico es alto (80 - 90%), la composición de dichas fuentes (en cuanto a dipéptidos y -- aminoácidos) no es la adecuada para expresar la actividad de glucosa isomerasa. Otra razón que podría esgrimirse para explicar la baja actividad obtenida en los medios aparentemente muy ricos en las fuentes de nitrógeno, es que los métodos de producción y de recuperación de dichas mate-- rias primas son muy drásticos, ya que involucran temperaturas muy altas o variaciones de pH muy extremas, bajo estas condiciones se producen sustancias que podrían ser tóxicas para un microorganismo, lo que se reflejaría en una baja producción de la sustancia buscada.

Como se puede ver, en todos los medios se utilizó glucosa -- (0.5%) de grado reactivo, como fuente de carbono, por lo tanto, se cree que la baja actividad obtenida se debió, además de lo anteriormente di-- cho a un efecto negativo, dado por la interacción entre las diversas combinaciones realizadas.

4.7.4. Efecto de la Interacción de Melaza con Dos Diferentes Fuentes de Nitrógeno

Finalmente se tiene en la Tabla 20, que el medio de cultivo formado por melaza (2.0%), caseinato de sodio (0.5%), agua de cocimiento de maíz (1.0%), NaCl (0.8%) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01%), puede sustituir al medio de cultivo formado por glucosa (0.5%), peptona (0.5%), extracto de carne (0.3%), NaCl (0.8%) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01%), ya que produce 2.14 u/ml de caldo de cultivo contra 2.02 u/ml del medio de cultivo original.

En base a los resultados del experimento anterior, se consideraron nuevamente los medios cuya fuente de nitrógeno estaba formada -- por agua de cocimiento de maíz (1.0%) - peptona ind. (0.5%) y caseinato (0.5%) - peptona ind. (0.5%), para hacerlos interaccionar con melaza (2.0%). Como se puede ver en la Tabla 20, se logró aumentar la actividad enzimática en 1.32 y 1.77 u/ml respectivamente, y en base a estos resultados concluimos que el efecto tóxico, anteriormente mencionado, está dado por la peptona industrial, es posible, sin embargo, utilizar a dicha fuente, pero se requerirá un ensayo donde se involucren, diferentes concentraciones para saber en que nivel se neutraliza su efecto tóxico.

En ésta misma tabla, se puede ver que los medios 7 y 8 formados por caseinato de sodio (0.5%) - $(NH_4)_2SO_4$ (0.5%) y licor de maíz (1.0%) - $(NH_4)_2SO_4$ (0.5%) se obtuvo una actividad de 0.50 y 0.53 u/ml, respectivamente, la cual resultó muy baja, aunque algunos autores (Heady et al., 1973) reportaron aumentos en la actividad enzimática, cuando enriquecieron sus medios de cultivo con fuentes de nitrógeno inorgánicas.

Tabla 20

EVALUACION DE DOS FUENTES DE NITROGENO
INTERACCIONANDO CON MELAZA

Medio	Fuente de carbono y nitrógeno (%)	Actividad enzimática micromol G/min u/ml
1	Glucosa 0.5	200.7 2.02
	Peptona 0.5	
	Ext. carne 0.3	
2	Melaza 2.0	211.7 2.14
	Licor maíz 1.0	
	Caseinato 0.5	
3	Melaza 2.0	130.2 1.32
	Licor maíz 1.0	
	Peptona Ind. 0.5	
4	Melaza 2.0	172.9 1.77
	Peptona Ind. 0.5	
	Caseinato 0.5	
5	Melaza 2.0	158.6 1.60
	Peptona Ind. 0.5	
	*P.V.H. 0.5	
6	Melaza 2.0	115.9 1.18
	Ex. lev. in. 0.5	
	Caseinato 0.5	
7	Melaza 2.0	50.0 0.50
	Caseinato 0.5	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	
8	Melaza 2.0	50.6 0.53
	Licor maíz 1.0	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	

*Proteína vegetal hidrolizada

Todos los medios se complementaron con: NaCl (0.8%) y MgSO₄ (0.01%).

Resulta también notable el aumento sustancial logrado en todos los medios de cultivo, cuando se sustituyó la glucosa de grado reactivo por melaza, el aumento mas importante se puede apreciar en los medios 2,3 y 4. En los medios 5 y 6 formados por peptona ind. (.05%) - P.V.H. (0.5%) y extracto de levadura ind. (0.5%) y caseinato de sodio (0.5%) se obtuvieron 1.60 y 1.18 u/ml, ya que comparados con el control (2.02 u/ml) y el medio 2 (2.14 u/ml) la actividad es relativamente baja, no se tomaron en cuenta.

4.7.5. Tratamiento al Medio de Cultivo Control y al Medio de Sustitución con NH_4OH . Efecto sobre Actividad

Durante la preparación del medio de cultivo seleccionado como sustituto, era necesario filtrar el agua de cocimiento de maíz y posteriormente ajustar a 7.0 el pH del filtrado (con NaOH, 2N) ya que de lo contrario, permanecía sumamente ácido (4.0 a 5.0), después de lo cual se agregaban los demás nutrientes, ésta vez, bajando ligeramente el pH (de 7.0 a 6.8). Este comportamiento no se obtenía con el medio de cultivo control, ya que durante la mezcla de los diferentes nutrientes, el pH no variaba sustancialmente. Puesto que era necesario utilizar sosa para el ajuste se decidió sustituir por un álcali mas suave (NH_4OH , IN), al mismo tiempo de que se dotaría al microorganismo de una mayor disponibilidad de nitrógeno. El tratamiento al que fueron sometidos los medios, se describe en la Figura 7, donde se puede observar que se utilizó el medio que se había adoptado como control y al medio que sustituyó a éste. Cabe señalar que el tratamiento de ajuste de pH y filtración se había enfocado al agua de cocimiento de maíz, por lo que para tratar de detectar

un efecto real del tratamiento, se seleccionó al extracto de carne del me dio control, para que se sufriera el mismo tratamiento. Esto hizo que -- el medio control y el medio de sustitución, se dividieran en dos, some- tiendo a una parte al tratamiento y la otra dejándola sin él.

Los resultados que se obtuvieron se describen en la Tabla 21 donde se puede observar que hay un efecto positivo aplicando el tratamiento a los medios, pero éste es mas notable, en el medio de sustitución ya que se logró un aumento de + 16.4% en la actividad, siendo tan solo de -- + 6.5% el logrado en el medio control. Ya ue dicho tratamiento no es -- muy complejo y se logra con él mejorar la actividad, podría ser fácilmen- te incorporado para su utilización.

Figura 7

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE CARNE Y EL AGUA DE
COCIMIENTO EN MAÍZ CON NH_4OH

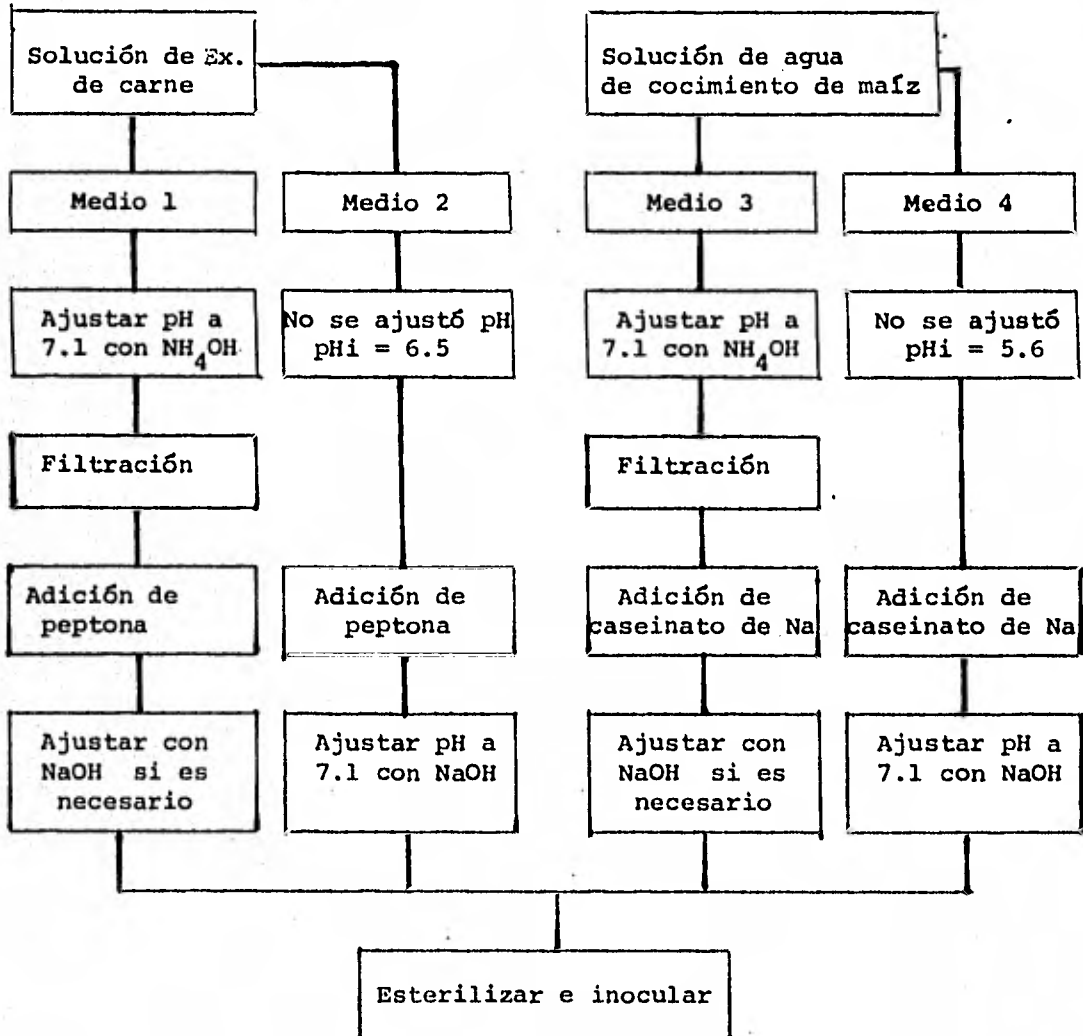


Tabla 21

TRATAMIENTO CON NH_4OH DEL MEDIO CONTROL Y DEL MEDIO DE SUSTITUCION. EFECTO SOBRE ACTIVIDAD ENZIMATICA

Formulación (%)	Tratamiento con NH_4OH	Actividad enzimática micromol G/min u/ml
Glucosa 0.5 Peptona 0.5 Ex. carne 0.3	sin	187.2 1.94
Glucosa 0.5 Peptona 0.5 Ex. carne 0.3	con	195.2 2.06
Melaza 2.0 Caseinato 0.5 Licor 1.0 maíz	sin	208.0 2.10
Melaza 2.0 Caseinato 0.5 Licor 1.0 maíz	con	224,9 2.48

Todos los medios se complementaron con: NaCl (0.8%) y MgSO_4 (0.01%).

CONCLUSIONES

Situado en su contexto general, la manipulación del medio ambiente de un microorganismo, es solo uno de los numerosos factores de cualquier proceso que busque producir enzimas por vía fermentativa, pero al mismo tiempo, es uno de los factores que deben ser asegurados, de tal suerte, que no produzcan variaciones negativas dentro del proceso.

Es bien sabido, que cuando un microorganismo se adapta completamente a un medio ambiente, se reducen las posibilidades de cambios en él, que repercutan negativamente en la producción. De ahí que, cuando se trabaja con una cepa obtenida por procesos de mutagénesis, se debe cuidar el medio ambiente al que estará sometida, y al mismo tiempo, se deberá -- tratar de optimizar el medio de crecimiento con el objeto de maximizar la productividad de la enzima (unidades de actividad enzimática/fermentador/tiempo) por unidad de costo de operación, por lo que es necesario, una -- evaluación constante del medio ambiente de la cepa productora.

De ahí que, evaluando los resultados obtenidos en el presente trabajo, y de acuerdo al objetivo fijado al iniciar el mismo, se logró -- obtener un medio de producción, que podría sustituir al medio de cultivo de grado reactivo. Los resultados de actividad enzimática por mililitro de caldo de cultivo en el nuevo medio, son más altos que los dados por el control, lo que resulta alentador, ya que dicho medio, puede todavía ser sometido a un proceso de optimización, del que podrían esperarse resultados de actividad todavía mayores. Dada la estructura del medio de cultivo encontrado como sustituo, se propone la optimización de éste, por el --

Método de Box Wilson (Box, Wilson, 1951), ésta metodología permitiría en contrar rápidamente las concentraciones más idóneas, para una mayor pro-..... ducción de la enzima.

La actividad máxima encontrada en el medio de sustitución fué de 2.48 u/ml, la cual supera a la máxima encontrada en el medio control - 2.18 u/ml, pero no supera a la reportada en la literatura para este micro organismo, 4.7 u/ml (Bucke, 1977). Sin embargo, esta actividad se obtuvo utilizando un medio de cultivo de grado reactivo y realizando la fermen- tación en un vaso de 14 l, donde las condiciones de pH, temperatura, ae-- reación y agitación estuvieron controladas. Por lo que se piensa que una vez lograda la optimización del medio de cultivo, la siguiente etapa se-- ría el salto al fermentador donde se pudieran optimizar las condiciones - físicas para este nuevo medio. Esto permitiría seguramente aumentar la - actividad enzimática mas allá de la reportada por Bucke, convirtiendo a - este proceso muy atractivo para la industria.

Lo que se plantea en este trabajo es solo parte de una alter nativa para aliviar el déficit de azúcar en México. Como anteriormente se dijo, la crisis en la que se encuentra la industria azucarera es la con secuencia de una serie de factores adversos, dentro de los que destaca, - por una parte, el estancamiento de las superficie dedicadas al cultivo de caña, la presencia de factores climáticos adversos, la baja productividad de la planta industrial, el crecimiento acelerado de la demanda atribui-- ble al aumento de la población y la prevalencia de patrones de consumo -- inadecuados. Por lo que la producción de jarabes de glucosa ricos en --

fructosa a través de la enzima, glucosa isomerasa es impostergable, en -
un país que como México, es deficitario en su producción.

BIBLIOGRAFIA

1. Barker, S.A., P.J. Somers, and B.W. Hatt
U. S. Patent 3875 140 (1975).
2. BCE. Publicación del Departamento de Planeación del Banco Nacional
de Comercio Exterior (1981).
3. Bengston, L.B. and R.W. Lamm
U. S. Patent 3654 080 (1972).
4. Box, G.E.P. and K.B. Wilson
Journal of the Royal Stastical Society (series B) 13: 1 - 45 (1951).
5. Bucke, C.
Top. Enzymes Ferment. Biotech. Pub.: 77 Serie 1 P. 147 - 171 (1977).
6. Calam, C.T.
Process Biochemistry, June/July 19 - 46 (1967).
7. Casida, L.B.
Industrial Microbiology. New York, Wiley, (1968).
8. Cejka, A.
European J. Appl. Microbiol. 3, 145-156 (1976).
9. Cotter, W.P. et al.
U. S. Patent 3,623,953 (1971).
10. Danno, G.
Agric. Biol. Chem. 31: 284 (1967).
11. Danno, G.
Agric. Biol. Chem. 34: 1795 (1970).
12. Dische, Z. and E. Gorenfreund
J. Biol. Chem. 192: 583 (1951).
13. Godzicki, M.M.
Food Eng. 47: Ep 12, Ef 16. (1975).

14. Heady, R.E.; P. Forest, W. Jacaway; D. Grove
U. S. Patent 3,770,589 (1973).
15. Hirota, T. et al.
Japanese Patent 77,114,088 (1977).
16. Hizuka, H. et al.
British Patent 1,273,003 (1972).
17. Hizuka, H. et al.
U. S. Patent 3,622,463 (1973).
18. Hodge, J.E.
Agric. Food. Chem. 1, 928 (1953).
19. Kierstan, M.P.J.
Biotechnology and Bioengineering, Vol. XX p. 447-450 (1978).
20. Kingma, W.G.
Process. Biochemistry, April: 49-51 (1966).
21. Lai, C.L.
Report of Taiwan Sugar. Rest. Inst. 70: 27 (1975).
22. Lee, C.K. et al.
U. S. Patent 3,645,848. (1972).
23. Linko, Y. Y.; L. Pahjola and P. Linko
Process Biochemistry Julio/Agost. 12: 14 - 16, 32 (1977).
24. Marshall, R.O. and E.R. Kooi
Science 125: 648 (1953).
25. Meers, J.O.
German Patent 2,533,193 (1976).
26. Melaja, H.A.
U. S. Patent 3,692,582 (1972).
27. Miles Laboratories Inc.
British Patent 1,376,983 (1974).
28. Mitsuhashi, M. et al.
U. S. Patent 3,708,396 (1974).

29. Nicol, W.M.
Chemistry and Industry, June, p. 427-431 (1977).
30. Novo Industri Als.
Netherlans Patent 7,607,990 (1977).
31. Reed, G.
Enzymes in Food Processing. Academic Press, New York (1975).
32. Quintero, R.R.
Ingeniería Bioquímica, Alhambra Mexicana (1981).
33. Robinson, J.W.
Food Engineering, May, P. 57-61 (1975).
34. Sánchez, S.; K.L. Smiley
Appl. Microbiol. 29: 745-749 (1975).
35. Schnyder, B.J.
Die Starke, 26,409 (1974).
36. Shieh, K.K. et al.
German Patent 2,351,443 (1974).
37. Shieh, K.K. et al.
U. S. Patent 3,913-820 (1974).
38. Shieh, K.K.
U. S. Patent 4,008,793 (1977).
39. Sipos, T.
U. S. Patent 3,708,397 (1973).
40. Solomons, G.L.
Material and Methods in Fermentations. Academic Press, London (1969).
41. SPP. Publicación de la Secretaría de Programación y Presupuesto.
Secretaría de Programación. Dirección General de Análisis de Ramas
Económicas. 1981-1985.
42. Strandberg, G.W. and K.I. Smiley
Appl. Microbiology Vol. 21, Nº4, p. 588-593 (1971).
43. Suekane, M. et al.
U. S. Patent 3,826,714 (1974).
44. Takasaki, Y., Y. Kosugi, and A. Kambayashi
Fermentation Advances (Ed. D. Perlman). Acad. Press. New York (1979).

45. Takasaki, Y. et al.
Agric. Biol. Chem. 33: 1527 (1969).
46. Thomas, D. and G. Guef
Biotechnol. 32: 14 - 17 (1982).
47. Tsumura, N. and T. Sato
Agric. Biol. Chem. 29: 1129 (1965).
48. UNPASA, CNIA, 1970-1979. Estadísticas Azucareras de la Unión Nacional de Productores de Azúcar y la Comisión Nacional de la Industria Azucarera. p. 36-141.
49. Wandrip, E.K.
Food. Technology 25: 501-504 (1971).
50. Weber, P.
British Patent. 1410,579 (1975).
51. Wen Pin Chen
Process. Biochemistry, June - July p. 36-41 (1980).
52. Wen Pin Chen
Process Biochemistry, July - Ag. p. 30-35 (1980).
53. Werner, W., H.G. Ray and Z. Wielinger
Analyt. Chem. 252: 224-228 (1970).
54. Whistler, R.L.
Die Starke 25 Sahr. 1, Nr. 12 (1973).
55. Whitaker, J.R.
Principles of Enzymology for the Food Sciences V. 2 Ed. Dekker Ing. New York (1972).
56. Yamanaka, K.
Biochem. Biophys. Acta 151: 670 (1968).
57. Yamanaka, K.
Agric. Biol. Chem. V. 27 No. 4 p. 265-270 (1963).
58. Yamanaka, K., N. Takahara
Agric. Biol. Chem. 41 (10), 1909-1915 (1977).
59. Yoshimura, S. et al.
Agric. Biol. Chem. 30: 1015 (1966).
60. Zittan, L.P. Poulsen and S.H. Hemmingsen
Die Starke 27: 236 (1975).